



DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM MÚSCULO DE FRANGO POR LC-MS/MS: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO COM ÊNFASE NA AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ

Spisso BF¹, Pereira MU¹, Melo JMMC², Ferreira RG¹, Monteiro MA¹

¹Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)/FIOCRUZ,

²Ex-residente em Vigilância Sanitária do INCQS/FIOCRUZ

Introdução

Os ionóforos poliéteres são antibióticos produzidos por espécies do gênero *Streptomyces* spp. sendo empregados na medicina veterinária tanto como aditivos zotécnicos melhoradores de desempenho como anticoccidianos, a fim de prevenir a coccidiose, a principal enfermidade contagiosa parasitária em aves domésticas causada por protozoários do gênero *Eimeria* spp. (Spisso, 2010).

Seis ionóforos poliéteres são autorizados na avicultura de corte no Brasil, através da alimentação animal: lasalocida (LAS), maduramicina (MAD), monensina (MON), narasina (NAR), salinomicina (SAL) e senduramicina (SEN) (Brasil, 2015). Efeitos adversos à saúde de animais e humanos tem sido relatados através de casos de intoxicação aguda (Dorne et al., 2013). Resíduos em tecidos comestíveis de aves podem resultar em exposição humana e potencial risco à saúde através do consumo desses alimentos, caso as boas práticas veterinárias não sejam obedecidas, ou seja, caso esses anticoccidianos não sejam usados de acordo com as informações do rótulo de cada produto, respeitando as indicações quanto à espécie e fase de uso a que se destinam, dosagem na ração, período de retirada e demais restrições. Limites Máximos de Resíduos (LMR) foram estabelecidos de forma a garantir que a exposição humana através do consumo não exceda a ingestão diária aceitável (IDA) estabelecida de cada coccidiostático (Dorne et al., 2013). A fim de avaliar a exposição humana, como parte da avaliação de risco, e verificar o atendimento aos limites estabelecidos são necessários métodos analíticos sensíveis, confiáveis e exequíveis. O efeito matriz é reconhecido como o calcanhar de Aquiles da técnica de espectrometria de massas sequencial, uma vez que componentes presentes na matriz que não os analitos de interesse podem aumentar ou diminuir o sinal analítico, interferindo na quantificação (Taylor, 2005).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método para a determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em músculo de frango, com ênfase na avaliação do efeito matriz, a fim de contribuir com uma ferramenta analítica capaz de possibilitar futuras ações de vigilância sanitária na área de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal em cooperação com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária.



Material e Métodos

Desenvolvimento

O método foi desenvolvido para a determinação de resíduos em carne de frango dos seis ionóforos poliéteres autorizados em aves: LAS, MAD, MON, NAR, SAL e SEN. Nigericina (NIG) foi usada como padrão interno. Os estudos fundamentaram-se em experiências anteriores do laboratório para a determinação de ionóforos poliéteres em ovos (Spisso, 2010) e leite (Pereira, 2013), bem como artigos da literatura (Anastassiades et al, 2003; Stubbings; Bigwood, 2009). O método baseia-se na extração QuEChERS com acetonitrila, com adição de acetato de sódio e sulfato de magnésio e purificação com sorvente de Amina Primária e Secundária (PSA), empregando para a detecção/quantificação a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), com ionização eletrospray (ESI) positivo, no modo de aquisição de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Foram utilizadas as condições cromatográficas e espectrométricas descritas por Spisso (2010) e modificadas por Pereira (2013).

Avaliação do efeito matriz absoluto

O efeito matriz absoluto do método em relação à supressão ou aumento de sinal na fonte de ionização eletrospray do LC-MS/MS foi avaliado comparando-se a curva de calibração de cada analito obtida com solução padrão (curva no diluente) com aquela obtida com a matriz fortificada no final do procedimento (após todas as etapas de extração).

Avaliação da aplicabilidade do método em diferentes cortes de músculo de frango – Efeito matriz relativo

O efeito matriz relativo foi avaliado através da comparação de curvas de calibração obtidas com a fortificação de diferentes cortes de músculo de frango – coxa, sobrecoxa e peito - com a adição dos analitos no final do procedimento, em concentrações de 0,25 a 3 vezes o LMR, com a adição do padrão interno NIG. Uma amostra branca de cada matriz foi preparada e extraída conforme o procedimento. As curvas de calibração obtidas com os diferentes tipos de matriz (coxa, sobrecoxa e peito) foram avaliadas através do cálculo do desvio padrão relativo (RSD) dos coeficientes angulares das curvas de cada analito segundo abordagem descrita em POP específico do INCQS (INCQS, 2013).

Resultados e Discussão

Desenvolvimento

O uso de acetonitrila, acetato de sódio e sulfato de magnésio para extração, seguido de Amina Primária e Secundária (PSA) para a purificação forneceu recuperações dos analitos de 60 % a 93 % e desvios padrão relativos entre 3 % e 7 % (Tabela 1) (Melo, 2015). Além das boas recuperações e baixos valores de RSD para todos os analitos, o método demonstrou alta seletividade, sensibilidade e rapidez. A Figura 1 apresenta os cromatogramas de MRM da primeira transição dos ionóforos poliéteres referentes aos extratos obtidos nas concentrações dos respectivos LMR para cada substância.

Tabela 1 - Recuperação (Rec%) e desvio padrão relativo (RSD%) (Melo, 2015).

Analitos	Rec%	RSD%
LAS	60	3
MAD	93	5
MON	91	7
NAR	93	3
SAL	91	4
SEN	92	5

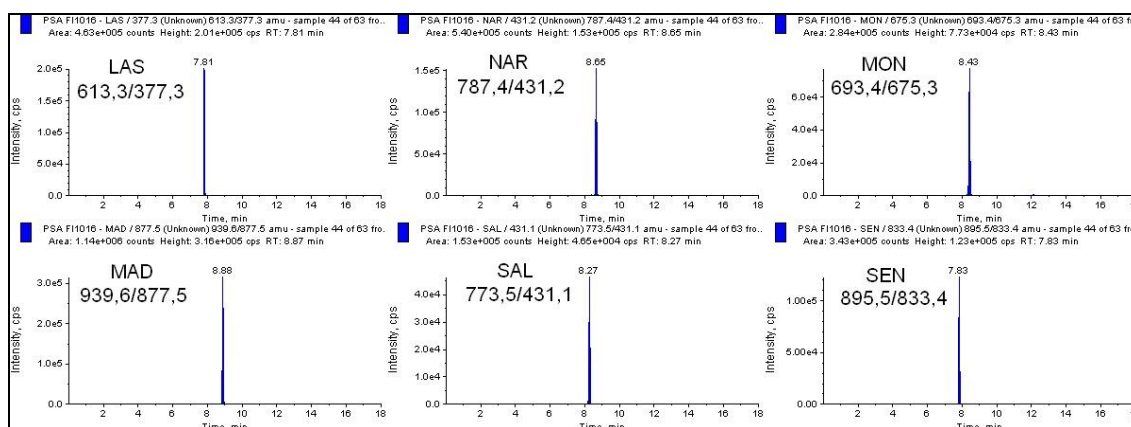


Figura 1 - Cromatogramas de MRM da 1ª transição dos ionóforos poliéteres nos extratos nas concentrações dos respectivos LMR para cada substância (Melo, 2015).

Avaliação do efeito matriz absoluto

A avaliação do efeito matriz absoluto foi efetuada pela comparação dos coeficientes angulares da curva de calibração no diluente e da curva de calibração na matriz fortificada no final do procedimento através do teste t (Student). Antes da comparação pelo teste t (Student), as variâncias residuais das duas curvas foram testadas para verificar se eram significativamente diferentes, através do teste F. A comparação dos coeficientes angulares pelo teste t indicou que para os analitos MAD, MON e NAR as curvas foram estatisticamente diferentes a $\alpha=0,05$, evidenciando efeito matriz absoluto. Portanto, para fins de quantificação dos analitos nas amostras, as curvas de calibração deverão ser obtidas na matriz.

Avaliação da aplicabilidade do método em diferentes cortes de músculo de frango – Efeito matriz relativo

Os RSD dos coeficientes angulares das curvas de calibração obtidas com os diferentes tipos de matrizes (coxa, sobrecoxa e peito) (Tabela 2) foram $< 15\%$, conforme recomendações (INCQS, 2013), indicando que com este procedimento de extração/purificação, para as matrizes estudadas, não foi observado efeito matriz relativo. A Figura 2 apresenta as curvas de calibração para o analito SAL nas três matrizes selecionadas (Melo, 2015).

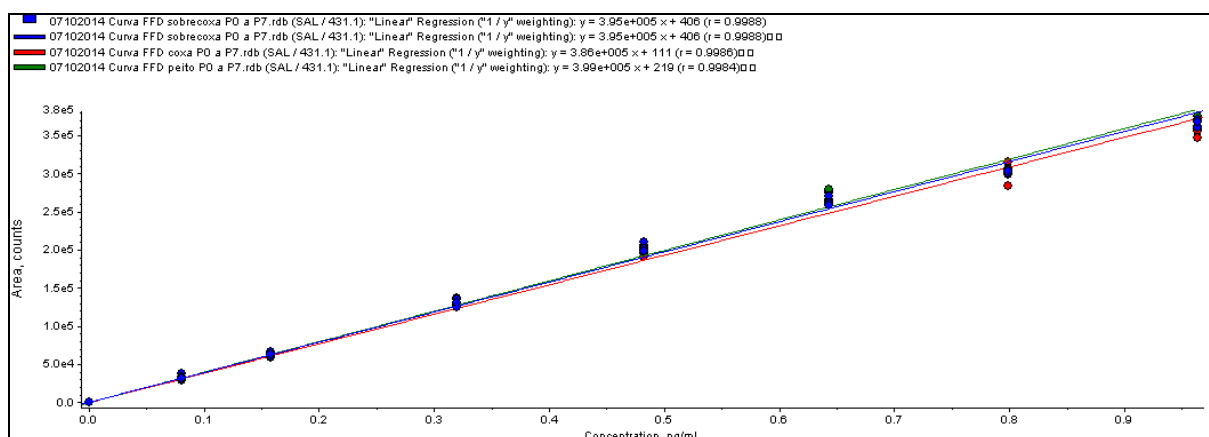


Figura 2 - Curvas de calibração para o analito SAL nas três matrizes selecionadas (Melo, 2015).



Tabela 2 - Coeficientes angulares das curvas de calibração (Melo, 2015).

Analitos	Sobrecoxa	Coxa	Peito	Média	RSD%
LAS	5,99E+05	5,35E+05	5,32E+05	5,55E+05	6,82
MAD	3,07E+05	2,85E+05	2,88E+05	2,93E+05	4,07
MON	4,44E+05	4,00E+05	4,27E+05	4,24E+05	5,24
NAR	4,69E+05	4,22E+05	4,56E+05	4,49E+05	5,41
SAL	3,95E+05	3,86E+05	3,99E+05	3,93E+05	1,69
SEN	2,29E+05	2,20E+05	2,14E+05	2,21E+05	3,42

Conclusão

O método desenvolvido mostrou-se adequado para a análise de diferentes tipos de tecido de frango: peito, coxa e sobrecoxa, uma vez que não foi observado efeito matriz relativo em função da composição diferenciada em relação aos constituintes da matriz, tais como lipídios e proteínas. Entretanto, efeito matriz absoluto foi verificado para alguns analitos, e dessa forma, para fins de quantificação, as curvas de calibração deverão ser obtidas na presença de matriz. O método desenvolvido, após validado, poderá ser aplicado no âmbito do Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) da Anvisa, contribuindo como ferramenta para a avaliação de risco.

Referências

- 1- Anastassiades M, Lehotay SJ. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *J. AOAC Int.* 2003. 86(2).
- 2- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aditivos melhoradores de desempenho e anticoccidianos registrados na CPAA/DFIP. Atualização 25/04/2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Alimenta%C3%A7%C3%A3o%20Animal/ADITIVOS%20AUTORIZADOS%20COMO%20MD%20e%20ANTICOCCIDIANOS%202015%20-%2025%20abril%20-%20Portal%20MAPA.pdf>. Acesso em: 30 de junho de 2015.
- 3- Dorne JLCM, Fernández-Cruz ML, Bertelsen U, Renshaw DW, Peltonen K, Anadon A, Feil A, Sanders P, Wester P, Fink-Gremmels J. Risk assessment of coccidiostats during feed cross-contamination: Animal and human health aspects. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 2013. 270: 196–208.



- 4- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS. POP 65.3120.136: Métodos de Análise para Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos: Protocolo de Validação. Rev.2. Rio de Janeiro, 2013. 59 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).
- 5- Melo JMMC. Desenvolvimento de um método para determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em músculo de frango por LC-MS/MS. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2015. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, INCQS, Fiocruz, 2015.
- 6- Pereira MU. Determinação de ionóforos poliéteres em leite por LC-MS/MS.. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2013. 149 f. Trabalho de conclusão de curso (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, INCQS, Fiocruz, 2013.
- 7- Spisso BF. Inocuidade de alimentos de origem animal: determinação de resíduos de ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosamidas em ovos e de tetraciclinas em leite por CLAE-EM/EM. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2010. 197 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária Sanitária) Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, INCQS, Fiocruz, 2010.
- 8- Stubbings G, Bigwood T. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. Anal. Chim. Acta. 2009. 637:68–78.
- 9-Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. Clin. Biochem. 2005. 38(4): 328–334.