

Leandro Alves Gomes de Oliveira<sup>a</sup>, Marlene Ulberg Pereira, Mychelle Alves Monteiro, Bernardete Ferraz Spisso  
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS): Av. Brasil, 4365 – Mangueiras – Rio de Janeiro - RJ CEP 21040-360.  
<sup>a</sup>Autor para correspondência – leandro.oliveira@incqs.fiocruz.br

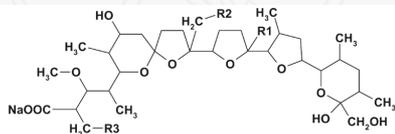
## INTRODUÇÃO

A administração de antibióticos em animais produtores de leite tem a finalidade de acelerar o crescimento de novilhas, de aumentar a eficiência produtiva e de tratar diversas infecções durante a lactação na vida adulta<sup>1</sup>. Entretanto, de acordo com Spisso et al<sup>2</sup>, o descuido no cumprimento das boas práticas veterinárias pode ocasionar níveis de resíduos inseguros em diferentes tecidos, com potenciais efeitos adversos à saúde humana devido às propriedades tóxicas e alergênicas das substâncias e à contribuição para o desenvolvimento de organismos resistentes.

Conforme descrito pela norma ABNT ISO Guia 35<sup>3</sup>, material de referência (MR) é um material suficientemente homogêneo e estável em relação a uma ou mais propriedades especificadas e que foi estabelecido como sendo apropriado para sua utilização pretendida em um processo de medição. Ele serve para a calibração de um sistema de medição, para a avaliação de um procedimento de medição, para a atribuição de valores a outros materiais e para o controle de qualidade.

Diz-se que um material é perfeitamente homogêneo em relação a uma propriedade quando não existir nenhuma diferença entre os valores de propriedade de uma parte (item) para outra. Na prática, se uma diferença entre os valores de uma parte (item) para outra for desprezível quando equiparada à componente de incerteza proveniente, por exemplo, da caracterização, o material é considerado homogêneo em relação a uma determinada propriedade<sup>3</sup>.

Segundo Watanabe et al<sup>4</sup>, o antibiótico mais amplamente utilizado em ruminantes, a fim de melhorar a eficiência alimentar e a produção global é a monensina (MON), da classe dos ionóforos polímeros. A substância (CAS 17090-79-8) é uma mistura de quatro análogos, A, B, C e D. A monensina A é a principal componente, representando 98% da composição<sup>5</sup>. A seguir é apresentada a estrutura química da MON.



| Factor | R1                               | R2 | R3               |
|--------|----------------------------------|----|------------------|
| A      | -CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -H | -H               |
| B      | -CH <sub>3</sub>                 | -H | -H               |
| C      | -CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -H | -CH <sub>3</sub> |

Figura 1. Estruturas química da monensina

Com a finalidade de aumentar a vida útil do material produzido, foi realizada uma liofilização do leite líquido, conhecida também como criodesidratação. Esse processo consiste em um exemplo particular de desidratação por sublimação, que é a transformação direta do gelo do alimento em vapor d'água, sem passar pelo estado de água líquida<sup>6</sup>.

## OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho é apresentar o estudo de homogeneidade de um MR produzido, pois esse parâmetro é um dos requisitos para a sua caracterização.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Fortificação do material

Primeiramente, 1 L de leite cru foi desnatado por centrifugação a 0 ° C, 11,5 rad/s por 10 minutos e fortificado com solução padrão de monensina, em concentração próxima ao Limite Máximo de Resíduo em Leite<sup>7</sup>. Aliquotas de aproximadamente 2,5 mL desse leite foram distribuídas em 116 frascos de vidro âmbar e congeladas a -70° C para posterior liofilização.

### Liofilização

As amostras do lote foram organizadas em 4 suportes. Todo o lote foi desidratado por 24 horas em liofilizador da marca Liotop, modelo K105. Os parâmetros foram temperatura a 103° C e 92 µmHg de vácuo no final do processo. Os frascos foram lacrados e armazenados a -70° C.



Figura 2. Coleta de leite cru, centrifuga e liofilizador

### Estudo de homogeneidade

Para o estudo de homogeneidade foram utilizados 16 frascos escolhidos por amostragem aleatória estratificada. As amostras foram ressuspensas com aproximadamente a mesma quantidade de água perdida durante a liofilização. A extração dos analitos foi realizada pelo método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe), baseado na extração com acetonitrila e adição dos sais acetato de sódio e sulfato de magnésio, seguida da determinação da MON no leite pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS). O método empregado é capaz de determinar resíduos de seis ionóforos polímeros em leite, incluindo a MON, e foi desenvolvido e validado por Pereira<sup>8</sup>, segundo o Procedimento Operacional Padrão<sup>9</sup>, que se baseia na Decisão 657/2002<sup>10</sup>. Os resultados foram avaliados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA).



Figura 3. Leite em pó liofilizado e ressuspensão<sup>11</sup>, sistema LC-MS/MS

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método utilizado foi validado na faixa de 1 a 6 ng/mL para a MON e apresentou limite de detecção de 0,06 ng/mL, limite de quantificação de 0,1 ng/mL e recuperação em condições de precisão intermediária de 103,7% com 9,6% de desvio padrão relativo.

Uma das condições para a produção de materiais de referência é o estudo de homogeneidade, pois é um dos elementos fundamentais para a garantia da conservação das propriedades físico-químicas em todos os MR produzidos<sup>11,12</sup>. Inicialmente, uma regressão linear foi empregada para detectar possíveis tendências na preparação da amostra, avaliando-se as médias de concentração nos frascos (média de valores de injeção) como uma função do número de sequência. A Figura 4 apresenta o gráfico de tendência, e a Tabela 1 a ANOVA. Como o valor de Significance F > 0,05, conclui-se que não foram observadas tendências nas amostras (frascos) e o lote é adequado para certificação.

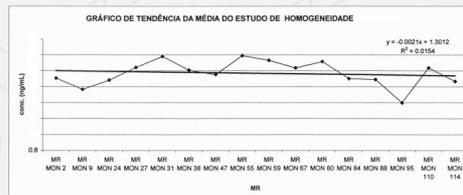


Figura 4. Gráfico de tendência do estudo de homogeneidade

Tabela 1. Análise de variância fator único.

| ANOVA      | df | SS       | MS       | F           | Significance F |
|------------|----|----------|----------|-------------|----------------|
| Regression | 1  | 0,001431 | 0,001431 | 0,219189318 | 0,646863782    |
| Residual   | 14 | 0,091394 | 0,006528 |             |                |
| Total      | 15 | 0,092825 |          |             |                |

A contribuição da incerteza da homogeneidade foi estimada pela análise de variância fator único, ANOVA (Tabela 2), empregando-se os valores de média quadrática entre os grupos (MS Between Groups) e dentro dos grupos (MS Within Groups). A incerteza da homogeneidade,  $u_{hb}$  foi de 3,86%.

Tabela 2. Análise de variância fator único.

| ANOVA          | Source of Variation | SS     | df | MS       | F        | P-value  | F crit   |
|----------------|---------------------|--------|----|----------|----------|----------|----------|
| Between Groups | Between Groups      | 0,3713 | 15 | 0,024753 | 1,656665 | 0,093646 | 1,880175 |
|                | Within Groups       | 0,7172 | 48 | 0,014942 |          |          |          |
| Total          |                     | 1,0885 | 63 |          |          |          |          |

## CONCLUSÃO

A produção de um material de referência de MON em leite faz parte de um projeto inovador, uma vez que não existe ainda nenhum fornecedor desse material. O MR produzido, após constatada a sua homogeneidade e estabilidade (dados não apresentados), será caracterizado de forma a possibilitar sua certificação. O material de referência certificado (MRC) possibilitará a melhoria da qualidade das análises em laboratórios de resíduos de antimicrobianos em alimentos e o respaldo às ações de controle e fiscalização sanitária.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Inovação Tecnológica (INOVATEC) - Fundação Oswaldo Cruz pela bolsa concedida a Leandro Alves Gomes de Oliveira.

## REFERÊNCIAS

- Brown KD, Kulis J, Thomson B, Chapman T, Mawhinney DB. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and Rio Grande in New Mexico. *Sci Tot Environ*. 2006; 366(2-3):772-83.
- Spisso BF, Monteiro MA, Pereira MU, Ferreira RG, da Costa RP, Carlos BS, Negris STC, de la Cruz MHC, Nóbrega AW. Preparation of in-house reference material of benzylpenicillin in milk and results of a Brazilian proficiency testing scheme. *Accred Qual Assur*. 2013; 18(4):323-31.
- ABNT ISO Guia 35. Materiais de referência - Princípios gerais e estatísticos para certificação. Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2012.
- Watanabe N, Harter TH, Bergamaschi BA. Environmental occurrence and shallow ground water detection of antibiotic monensin from dairy farms. *J Environ Qual*. 2008; 37(5):S78-S85.
- World Health Organization. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Prepared by the Seventieth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA); 2008; Geneva, Switzerland. WHO Press; 2009. p. 240.
- Pereira JAO, Rodriguez MIC, Alvarez LF, Sanz MLG, Mingulón GDGF, Perales LH et al. Tecnologia de Alimentos - Componentes dos alimentos e processos. Rio Grande do Sul, Brasil: ed. Artmed; 2005; 239.
- European Union. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. European public MRL assessment report. Europe: European Medicines Agency; 2013.
- Pereira MU. Determinação de resíduos de ionóforos polímeros em leite por LC-MS/MS [Dissertação de mestrado] Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; 2013.
- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Métodos de Análise para Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos: Protocolo de Validação. Rev. 1. Rio de Janeiro (RJ): Fundação Oswaldo Cruz (BR); 2009. 39p. POP 65.31.20.136: Manual da Qualidade. Seção 4.3.
- União Europeia. Comissão das Comunidades Europeias. Decisão no 2002/657/CE. Da execução ao dispositivo na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativo ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. Bruxelas; 2002.
- Carlos BS. Produção de material de referência de monensina em leite. Rio de Janeiro: 2012. Sep. Apresentação do Relatório Final do Programa de Inovação Tecnológica (Inovatec). 2012: Figura leite liofilizado e ressuspensão; p. 18.
- ABNT ISO Guia 34. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Associação Brasileira de Normas Técnicas 2004.