

Produção de material de referência certificado para análises de alimentos: cloranfenicol em leite

Production of certified reference material for food analysis: chloramphenicol in milk

E. C. P. Rego^{1,3}, E. F. Guimarães¹, J. M. Rodrigues², A. D. Pereira Netto³

¹Laboratório de Análise Orgânica, ²Dimqt, Dimci, Inmetro (Rio de Janeiro, Brasil);

³UFF, Departamento de química analítica (Rio de Janeiro, Brasil).

E-mail: ecrego@inmetro.gov.br

Resumo: Cloranfenicol (CAP) é um antibiótico proibido para o tratamento de animais produtores de alimentos. Neste trabalho foi produzido um Material de Referência Certificado (MRC) para CAP em leite em pó, material até então inédito, para ser utilizado na validação e no controle de qualidade. O leite naturalmente contaminado com resíduos de CAP foi obtido após administração do medicamento em uma vaca, posteriormente pasteurizado e processado para obter leite em pó. O lote foi submetido aos estudos de homogeneidade, caracterização e estabilidade, além do cálculo de incertezas. O valor certificado para CAP total no leite reconstituído foi $(1,96 \pm 0,45) \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Palavras-chave: Cloranfenicol; leite; MRC; ELL-PBT; ID-CLAE-EM/EM.

Abstract: Chloramphenicol (CAP) is an antibiotic banned for treatment of food-producing animals. In this work was produced one Certified Reference Material (CRM) for CAP in milk powder, a new material at this time, and it can be used for method validation and quality control. The incurred milk contaminated with CAP was obtained after administration of the drug in a cow, then pasteurized and processed to obtain milk powder. The batch was submitted to studies of homogeneity, characterization and stability, besides calculation of uncertainties. Certified value for total CAP in reconstituted milk was $(1.96 \pm 0.45) \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Keywords: Chloramphenicol, milk, CRM, LLE-LTP and ID-LC-MS/MS

1. INTRODUÇÃO

O cloranfenicol (CAP) é um antibiótico de amplo espectro, que teve seu uso proibido no tratamento

veterinário de animais produtores de alimentos em diversos países, inclusive no Brasil [1]. Estudos toxicológicos indicaram que o CAP é um fármaco potencialmente carcinogênico, sendo

classificado pela IARC (Internacional Agency for Research on Cancer) como uma substância do Grupo 2A [2]. Um limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) para métodos analíticos de $0,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ foi estabelecido para detecção de resíduos de CAP em diversos alimentos, inclusive leite [3]. No entanto, resíduos de CAP ainda são encontrados em muitos produtos alimentícios, mesmo com a proibição de uso. De acordo com o Sistema Rápido de Alerta para Alimentação Animal e Humana (RASFF), entre 2002 e 2014, das 449 notificações reportadas de contaminação por CAP em várias matrizes, 40 correspondiam a produtos lácteos [4]. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou o Programa de Análise de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) e também encontrou contaminação por CAP em leite nos últimos anos [5]. Esses resultados mostram que a presença deste antibiótico proibido nos alimentos é um problema real em todo o mundo. Para superar este desafio, o Inmetro tem um papel importante de prover a rastreabilidade e a confiabilidade destas medições, o que ocorre no âmbito das atividades da Divisão de Metrologia Química e Térmica (Dimqt), que tem a responsabilidade de desenvolver procedimentos de referência, implantar métodos primários e desenvolver e certificar materiais de referência.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas da produção de um lote candidato a material de referência certificado de CAP em leite em pó, inclui o preparo do lote de material e todos os estudos de certificação conforme estabelecido na norma ISO 17034 [6] e no ISO Guia 35 [7].

Antes do preparo do lote candidato a MRC, foi realizado um estudo de viabilidade, de modo a avaliar a forma mais adequada de preparo do mesmo [8]. Resumidamente, a etapa de preparo

consistiu na obtenção de leite cru contaminado após administração do medicamento em uma vaca, pasteurização e secagem em *spray-dryer* para obtenção de leite em pó, mistura com leite branco (isento de contaminação) para obtenção do nível de concentração de CAP desejado, e homogeneização em homogeneizador em Y. O lote foi envasado em 350 unidades contendo 2 g de leite em pó. Após envase, os frascos passaram por etapa de liofilização e selagem sob vácuo, sendo posteriormente armazenados a -80°C .

No processo de certificação, foram realizados estudos de homogeneidade, de caracterização, de estabilidade de curta duração e de longa duração, com a estimativa da contribuição de incerteza [6,7]. Em todos os estudos, o teor de água do leite foi avaliado, sendo determinado em duplicata logo após se abrir o frasco do MRC, pelo método de titulação coulométrica Karl Fisher. As análises de resíduos de CAP foram preparadas pelo método de extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura (ELL-PBT) e analisadas por cromatografia líquida com espectrometria de massas em série (CLAE-EM/EM), sendo as amostras preparadas em duplicata sem hidrólise enzimática para o CAP livre e com inclusão da etapa de hidrólise enzimática para o CAP total [9]. Uma curva analítica na faixa de $0,1$ a $5,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de CAP e $1,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de padrão interno (d_5 -CAP) foi preparada gravimetricamente. Para garantir a rastreabilidade metrológica ao mol, as concentrações foram corrigidas pela pureza do padrão de CAP usado, $99,55\% \pm 0,57\%$ ($k=2$; 95%), obtida pela combinação dos resultados de três abordagens: calorimetria exploratória diferencial (CED), balanço de massas e Ressonância magnética nuclear quantitativa (RMNq).

Para o estudo de caracterização foram usadas 5 unidades selecionadas aleatoriamente e preparadas em duplicata. Dezesesseis amostras foram aleatoriamente selecionadas do lote para o

estudo de homogeneidade. O estudo de estabilidade de curta duração, para estabelecer as condições de transporte, foi realizado durante 60 dias no modo isócrono, nas temperaturas de 20 e 50 °C com temperatura de referência de -80 °C. O estudo estabilidade de longa duração, para definir as condições de armazenamento, foi realizado no modo clássico durante 8 meses, na temperatura de -20 °C com temperatura de referência de -80 °C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O lote produzido está representado na figura 1.



Figura 1. Frascos do lote candidato à MRC de CAP em leite em pó

A incerteza de homogeneidade (s_{bb} ou u_{bb}) foi calculada através das Equações 1 e 2, sendo adotado o maior valor entre elas, e a contribuição da não-homogeneidade ($C(\%)$) pela Equação 3.

$$s_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{entre} - MQ_{dentro}}{n}} \quad (1)$$

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{dentro}}{n} \sqrt{\frac{2}{gl_{dentro}}}} \quad (2) \quad C(\%) = \frac{(u_{bb}) * 100}{média} \quad (3)$$

O grau de não-homogeneidade para o parâmetro teor de água foi de 4,0%. As mesmas amostras foram usadas para a avaliação da homogeneidade da fração em massa de CAP na forma livre e CAP total (soma das formas livre e conjugada). O grau de não-homogeneidade para CAP livre e CAP total foi respectivamente de, 4,7% e 2,6%. O lote foi considerado homogêneo para todos os parâmetros, visto que o grau de heterogeneidade foi inferior a 6% ($u_{bb}(\%) < 6\%$), condição estabelecida no início do projeto de certificação.

No estudo de estabilidade de curta duração, o CAP livre e total foram estáveis por 60 dias a

50 °C e por 14 dias a 50°C para teor de água. Considerando os resultados encontrados para o parâmetro teor de água, a condição mais segura de transportar o material é por no máximo 14 dias na temperatura máxima de 50 °C, mesmo que o estudo de estabilidade com o CAP não tenha demonstrado perda de estabilidade até 60 dias. O material poderá ser transportado a temperatura ambiente, não necessitando de refrigeração. Considerando que esta é a condição de transporte, as incertezas de estabilidade de curta duração para CAP livre e CAP foram calculadas para 50 °C, usando o tempo de 14 dias. As incertezas finais para estabilidade de curta duração foram 0,0068 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para CAP livre e 0,0176 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para CAP total (tabela 1).

Tabela 1. Estudo de estabilidade de curta duração.

Parâmetro	Valor p	Incerteza	Estável (dias)
Teor água 20 °C	0,061	0,127 g/100g	30
Teor água 50 °C	0,093	0,267 g/100g	14
CAP livre 20 °C	0,831	0,031 $\mu\text{g/kg}$	60
CAP livre 50 °C	0,578	0,029 $\mu\text{g/kg}$	60
CAP total 20 °C	0,080	0,051 $\mu\text{g/kg}$	60
CAP total 50 °C	0,956	0,076 $\mu\text{g/kg}$	60

Nos estudos de estabilidade de longa duração de teor de água e para fração em massa de CAP total, obtido com hidrólise enzimática, o material demonstrou estabilidade durante 8 meses, nas temperaturas -80 °C e -20 °C. A incerteza de estabilidade de longa duração (u_{el}) foi calculada multiplicando-se o desvio-padrão da inclinação referente ao estudo de longa duração pelo tempo de estudo do material, no caso 8 meses a -20°C, que será a temperatura recomendada para o cliente armazenar o material. A u_{el} encontrada para teor de água foi de 0,086g.100g⁻¹ e para o CAP total foi de 0,111 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. A u_{el} para CAP livre no lote candidato à MRC foi calculada apenas na temperatura de -80 °C, onde foi demonstrada estabilidade durante 8 meses. A u_{el} para fração em massa de CAP livre foi de 0,055 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. O CAP livre terá apenas um valor informativo neste material.

A questão principal ao medir o teor de água foi avaliar se seria necessário fazer a correção para base seca do material. O material foi estável em relação ao parâmetro umidade sob as condições em que o candidato à MRC deverá ser armazenado pelo cliente (-20 °C). Assim o valor de CAP em base úmida poderá ser utilizado e não será necessário corrigir para base seca. O teor de água no material (1,91 g.100g⁻¹) terá valor informativo devido ao uso pretendido do MRC, que é para análises de CAP em leite.

Os valores informativos e certificados deste MRC estão resumidos nas tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2. Valor informativo e incerteza teor de água.

Valor (g.100g ⁻¹)	u_{bb}	u_{ec}	u_{el}	u_{car}	u_c	U
1,91	0,084	0,062	0,086	0,033	0,14	0,28

Tabela 3. Valor informativo e incerteza CAP livre.

Valor (µg.kg ⁻¹)	u_{bb}	u_{ec}	u_{el}	u_{car}	u_c	U
0,31	0,018	0,006	0,055	0,038	0,07	0,14

Tabela 4. Valor certificado e incerteza CAP total.

Valor (µg.kg ⁻¹)	u_{bb}	u_{ec}	u_{el}	u_{car}	u_c	U
1,96	0,049	0,017	0,111	0,192	0,227	0,45

Onde as incertezas: u_{bb} = homogeneidade; u_{ec} = estabilidade de curta duração; u_{el} = estabilidade de longa duração, u_{car} = caracterização; u_c = combinada e U = expandida ($k=2$, 95%).

Dessa forma, o material naturalmente contaminado com resíduos de CAP foi devidamente certificado para fração em massa de CAP em leite em pó, obtido com etapa de hidrólise enzimática.

4. CONCLUSÕES

O MRC para CAP em leite em pó foi produzido e certificado com sucesso. Um grande desafio foi a obtenção de um material naturalmente contaminado (não fortificado) para ser usado como matéria-prima do lote. O lote demonstrou homogeneidade adequada para todos os parâmetros estudados. De acordo com o estudo de estabilidade de curta duração, o material pode ser transportado por no máximo 14 dias a uma temperatura máxima de 50 °C, e por 30 dias a

uma temperatura máxima de 20 °C (transporte refrigerado). O material é estável se armazenado a -20 °C (ou temperaturas menores) e tem como valor certificado (1,96 ± 0,45) µg.kg⁻¹ de CAP total, obtido com procedimento de hidrólise enzimática. O material também apresenta valores informativos para a forma livre do CAP de (0,31 ± 0,13) µg.kg⁻¹, e (1,91 ± 0,28) g.100g⁻¹ de teor de água. O nível de CAP livre está próximo ao LMDR sendo útil para validação do método neste nível, auxiliando a detectar resultados falsos negativos.

5. REFERÊNCIAS

- [1] Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. MAPA – instrução normativa n° 90 de 27 de junho de 2003. Diário Oficial da União de 30/06/2003 seção 1, 4 páginas.
- [2] International agency for research on cancer. Iarc: monograph on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Lyon, 1990. 50: 169–193 páginas.
- [3] Commission regulation 2003/181/EC. Off. J. Eur. Commun.: 2003 L71 17.
- [4] Rasff portal. Disponível em: < <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/> >. Acesso em: 30 de maio de 2017.
- [5] Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Pamvet Monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo. Brasília, DF, 2009.
- [6] Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT ISO GUIA 34: Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro, 2012. 41 páginas.
- [7] Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT ISO GUIA 35: Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro, 2012. 73 páginas.
- [8] Rego E C P, Guimaraes E F, Rodrigues J M, Scarlato R, Nogueira R I, Pereira Netto A D 2016 *Measurement* **98** 300.
- [9] Rego E C P, Guimaraes, E F, Santos A L M, Mothé E S M, Rodrigues J M and Pereira Netto A D 2015 *Analytical Methods* **7** 4699.