

Estudo de viabilidade para o desenvolvimento de Material de Referência Certificado para metabólitos de nitrofuranos em músculo de frango

Feasibility study for the development of Certified Reference Material for nitrofurantol metabolites in Chicken Muscle

F G M Violante^{1,3}, E F Guimarães¹, H C Vital², N O C Zúniga³, F R Aquino Neto³

¹Laboratório de Análise Orgânica, Dimqt, Dimci, Inmetro (Rio de Janeiro, Brasil); ²Centro Tecnológico do Exército, CTEEx (Rio de Janeiro, Brasil); ³UFRJ, Instituto de Química, LAB RES – LADETEC (Rio de Janeiro, Brasil).

E-mail: fmviolante@inmetro.gov.br

Resumo: Os Materiais de Referência Certificados (MRC) conferem às medições, qualidade e rastreabilidade ao Sistema Internacional de Unidades (SI). Os resultados de um estudo de viabilidade para o desenvolvimento de um (MRC) para valores de fração mássica de metabólitos de nitrofuranos em músculo de frango são apresentados neste trabalho. Um minilote de Material de Referência foi produzido a partir de músculos de peito de frango liofilizados contendo resíduos dos metabólitos AOZ e AMOZ. Foram avaliados a granulometria, a estabilidade do teor de água, o efeito do tratamento por irradiação, bem como o grau de heterogeneidade do valor da propriedade no material.

Palavras-chave: Metabólitos de nitrofuranos, Material de Referência Certificado, Resíduos de drogas veterinárias, Segurança alimentar, Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem.

Abstract: Certified Reference Materials (CRM) provide measurements with quality and traceability to the International System of Units (SI). The results of a feasibility study for the development of a CRM for mass fraction of nitrofurantol metabolites in chicken muscle are presented in this work. A small-scale batch of material was produced from freeze-dried chicken breast muscles containing residues of AOZ and AMOZ metabolites. The granulometry, the stability of the water content, the effect of the treatment by irradiation and the degree of inhomogeneity of the property values were evaluated.

Keywords: Nitrofurantol Metabolites, Certified Reference Material, Veterinary drug residues, Food safety, Liquid chromatography- tandem mass spectrometry.

1. INTRODUÇÃO

Os Materiais de Referência Certificados (MRC) conferem aos resultados das medições em química analítica, rastreabilidade ao Sistema Internacional de Unidades (SI). Na área de drogas veterinárias em alimentos, esses MRC ganham uma importância ainda maior frente aos problemas de restrições comerciais de alguns países, como as medidas de controle em alimentos adotadas pela União Européia com a Diretiva 96/23/CE [1]. Os nitrofuranos são drogas veterinárias utilizadas no tratamento de infecções no trato gastro-intestinal de animais como porcos e aves. Os principais metabólitos dos nitrofuranos, 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ), 3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona (AMOZ), semicarbazida (SEM) e 1-aminoidantoína (AHD) [2] estão enquadrados no anexo IV do regulamento 2377/90 da União Européia [3], onde estão as substâncias cujo uso não é permitido. No Brasil, A Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003 [4] também proíbe o seu uso.

Um estudo de viabilidade pode ser realizado para se avaliar a forma de preparo de um Material de Referência adequado ao uso pretendido. Este trabalho tem como objetivo realizar um estudo de viabilidade para o desenvolvimento de um MRC para valores de fração mássica de metabólitos de nitrofuranos em músculo de frango. Os metabólitos AOZ e AMOZ são objeto desse estudo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Origem das amostras

Foram produzidos dois minilotes de Material de Referência. O **minilote A** (branco) foi produzido a partir de peitos de frango adquiridos no mercado local. O **minilote B** foi produzido a partir de amostras de peitos de frango cujos metabólitos foram incorporados à matriz através do processo metabólico das drogas precursoras administradas aos animais. A criação dos animais até o abate foi realizada no Colégio Técnico Agrícola Ildelfonso

Bastos Borges (CTAIBB), localizado no município de Bom Jesus do Itabapoana, RJ [5].

2.2. Preparo do Material

Peitos de frango provenientes de animais tratados com os antibióticos furazolidona e furaltadona (que dão origem aos metabólitos AOZ e AMOZ) foram cortados em pequenos cubos, triturados separadamente em um liquidificador (Waring, 7011S) e liofilizados separadamente por 24 h (LIOTOP, L101). Os peitos de frango liofilizados foram triturados em um moinho de facas (Retsch, GM 200) por 3 minutos a 10000 RPM, peneirados a 420 µm com o auxílio de um agitador de peneiras (Bertel) e armazenados separadamente. Os materiais foram analisados individualmente e misturados em um homogeneizador Y (Marconi, NA-201/5MO), juntamente com o branco, com o objetivo de obter um material final de concentração aproximada de 8 ng/g a 12 ng/g em base seca. O lote obtido foi envasado, liofilizado por 24 h (LIOTOP, L101) dentro do frasco. Os frascos foram fechados sob vácuo e lacrados (com tampas de borracha e lacre de alumínio). Foram produzidos 45 frascos contendo aproximadamente 1,5 g de material liofilizado.

2.3. Avaliação da granulometria por microscopia

Partículas suficientemente pequenas e de tamanho homogêneo são importantes para evitar a segregação do material e sua consequente heterogeneidade. A análise foi realizada para amostras do **minilote B**, em um microscópio óptico marca Olympus modelo BX51M.

2.4. Estabilidade do Teor de umidade residual do Material de Referência

Nessa avaliação, amostras do **minilote A** foram armazenadas a diferentes temperaturas: -20 °C, 4 °C e 23 °C (ambiente do laboratório) ao abrigo da luz. Os frascos de vidro âmbar para produção das amostras do minilote foram secos em estufa a 105 °C e mantidos em dessecador até o momento do envase. As amostras foram analisadas em 5 ocasiões ao longo de um período de 24 meses, sendo que em

cada ponto no tempo foram analisadas duas amostras de cada temperatura estudada.

2.5. Teste de efeito da irradiação na redução da carga microbiológica

Nessa avaliação, amostras do frango oriundas do **Minilote A** foram submetidas a análise microbiológica antes e depois de serem irradiadas. Para isso, um grupo de amostras deste minilote foi submetido à radiação gama no CTE_x [6]. A contagem Padrão em placas [7] foi realizada para 2 frascos de amostras sem irradiar, e 2 frascos irradiados a cada dose aplicada: 3 kGy, 5 kGy e 7 kGy.

2.6. Homogeneidade

Sete amostras do **minilote B** foram selecionadas aleatoriamente para o teste de homogeneidade. As amostras foram analisadas em duplicata quanto à fração mássica dos metabólitos AOZ e AMOZ. A incerteza da heterogeneidade do material (u_{bb}) foi calculada a partir dos dados obtidos por ANOVA (1) [8] após o teste de Cochran para excluir possíveis variâncias discrepantes.

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

Onde, MQ_{entre} é a variação entre frascos; MQ_{dentro} é a variação dentro dos frascos e n , o número de replicatas.

As análises foram feitas por CLAE-EM/EM, utilizando calibração interna e os compostos análogos isotopicamente marcados (AOZ-D₄ e AMOZ-D₅) como padrões internos.

2.7. Teste do efeito da irradiação na concentração dos analitos.

Para esse teste, um grupo de amostras irradiadas do **minilote B** foi analisado contra outro grupo não irradiado do mesmo lote, em condições de repetibilidade, por CLAE-EM/EM. Foi realizado o teste “t” de comparação de médias para verificar se ocorreu alguma alteração significativa devido a irradiação a 7 kGy.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da granulometria por microscopia

Foram observadas partículas de forma alongada, cujo comprimento variou de 55 μ m a 214 μ m nas medições realizadas. Apesar dos esforços, fibras longas com comprimento de 500 μ m também foram observadas. Contudo, a homogeneidade do material não ficou comprometida conforme os resultados obtidos no teste de homogeneidade (*vide* 3.4).

3.2. Estabilidade do teor de água do Material de Referência

Foi possível verificar que o teor de umidade residual das amostras apresentou maior estabilidade a uma temperatura de armazenamento de -20°C (figura 1).

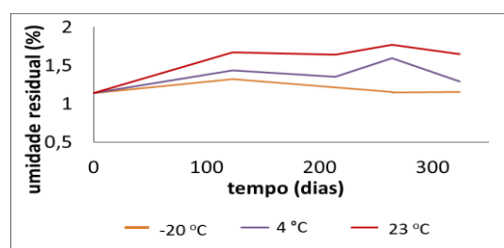


Figura 1. Estabilidade do teor de umidade residual do frango liofilizado.

3.3. Teste de efeito da irradiação na redução da carga microbiológica

Tabela 1. Resultados das análises microbiológicas das amostras irradiadas e sem irradiar.

Contagem – UFC/g				
Frasco (Repl.)	Sem irradiar	3 kGy	5 kGy	7 kGy
1 (1)	2,65 x 10 ⁵	2,2 x 10 ³	2,6 x 10 ²	1,0 x 10 ²
1 (2)	2,48 x 10 ⁵	4,3 x 10 ³	2,0 x 10 ²	1,1 x 10 ²
2 (1)	2,34 x 10 ⁵	2,0 x 10 ³	3,6 x 10 ²	1,5 x 10 ²
2 (2)	2,46 x 10 ⁵	2,6 x 10 ³	2,2 x 10 ²	1,1 x 10 ²

A dose de 7 kGy foi mais eficiente na redução da carga microbiológica inicial do material. A ordem de grandeza 10² da contagem se manteve inalterada quando se compara os resultados obtidos com 5 kGy e 7 kGy.

3.4. Homogeneidade

As curvas de calibração apresentaram um bom ajuste ao modelo linear bem como comportamento homocedástico. A partir dos resultados apresentados na tabela 2, podemos verificar que o material atingiu um grau de heterogeneidade (%) aceitável, com valores percentuais em torno de 1 %, se considerarmos, por exemplo, uma incerteza alvo de 10 % para o valor da propriedade como adequada ao propósito.

Tabela 2. Resultados para o teste de homogeneidade.

	AOZ	AMTZ
MQ_{entre}	0,10	0,07
MQ_{dentro}	0,07	0,03
u_{bb}	0,11	0,14
heterogeneidade (%)	1,01	1,32

3.5. Efeito da irradiação na concentração dos analitos

Tabela 3. Resultados obtidos para avaliação do efeito da irradiação na concentração dos analitos.

	AMTZ		AOZ	
	I	NI	I	NI
média (ng/g)	12,21	12,27	13,05	12,67
t	0,21		0,81	
t_{crítico}	2,18		2,18	

I : média para as amostras irradiadas

NI : média para as amostras não irradiadas

Conforme os resultados para o teste “t” de comparação de médias, estatisticamente não há diferença entre as médias das frações mássicas de AOZ e AMTZ para as amostras irradiadas e não irradiadas. Portanto, a irradiação aplicada a 7 kGy não alterou a concentração dos analitos.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a método proposto, incluindo as etapas de preparo, liofilização, homogeneização, irradiação a 7 kGy, pode ser aplicado para a produção de um candidato a Material de Referência para metabólitos de nitrofuranos em músculo de frango, utilizando as mesmas condições estabelecidas. Entretanto, cabe salientar que este

estudo foi realizado a partir do preparo de um minilote e, quaisquer extrapolações na quantidade de material produzido ou concentrações do material de partida, devem ser realizadas com cautela.

Referências:

- [1] Council Directive 96/23/EC 1996 *Official Journal of the European Communities* **10** L125.
- [2] Hoogenboom L A P, Polman T H G. In: Haagsma N, Rutier A, Czedik-Eysenberg P B 1993 *Proceedings of the Euroresidue II Conference*, Utrecht, Holanda, p. 376.
- [3] Council Regulation 2377/90. *Official Journal of the European Communities* 1990 **1** L224.
- [4] Brasil: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2003, Seção 1, p. 4.
- [5] Zúñiga N O C 2010 Desenvolvimento de criação experimental de frango de corte para viabilização de estudo de metabolização de nitrofuranos. Tese de doutorado, Rio de Janeiro: UFRJ, 211 f.
- [6] Vital H C e Vellozo S O 1996 *Anais do VI CGEN*. v. 3, Rio de Janeiro, RJ, p. 27-31.
- [7] Maturin L e Peeler J T 2001 “Chapter 3: Aerobic Plate Count”, In: Food and Drug Administration (FDA), *Bacteriological Analytical Manual Online*, 8. ed., Silver Spring, Berlin, 1998.
- [8] Associação Brasileira de Normas Técnicas. *ABNT ISO GUIA 35: Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação*. Rio de Janeiro, 2012, 73 p.

Agradecimentos:

Dra. Carla de Oliveira Rosas (INCQS/Fiocruz) pela realização das análises microbiológicas.

FAPERJ - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro.