



Projeto piloto de produção de material de referência de salinomicina em matriz ovo: estudo de homogeneidade e estabilidade de curta duração

Ferreira RG¹, Pereira MU¹, Monteiro MA¹, Spisso BF¹

¹Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)/ Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

INTRODUÇÃO

Materiais de referência representam ferramentas para o controle de qualidade de laboratórios acreditados ou que almejam a acreditação pela ISO/IEC 17025. Há uma escassez de materiais de referência na área de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal, o que dificulta o controle desses resíduos nos alimentos. Orientações sobre a preparação dos materiais de referência estão disponíveis nas ISO Guias 31, 34 e 35.

No Brasil, é autorizado o uso de anticoccidianos ionóforos poliéteres em rações para auxiliar na prevenção da coccidiose em frangos de corte e frangas de reposição. A presença de resíduos dessas substâncias em ovos ocorre através da contaminação (não intencional) em rações destinadas a poedeiras comerciais. Os ionóforos poliéteres não são usados na medicina humana. Estudos em animais e casos de exposição acidental em seres humanos têm mostrado que os ionóforos provocam efeitos cardiovasculares, insuficiência renal e outros sintomas (SPISSO et al, 2010a, DORNE et al, 2013, NOGUEIRA; FRANÇA; VERGAS, 2009).

Desde 2009 é estabelecido pela União Europeia, um Nível Máximo (de tolerância) de 3 µg/Kg para salinomicina em ovos (EUROPEAN UNION, 2009).

A proposta de se produzir um material de referência de salinomicina, um anticoccidiano ionóforo poliéter, tendo o ovo como matriz, é relevante para que os laboratórios possam expandir seu escopo analítico e melhorar significativamente a confiabilidade das análises, contribuindo assim para o controle destes resíduos em ovos.

Convém que materiais de referência sejam certificados com relação à homogeneidade, estabilidade, e o(s) valor(es) de propriedade certificado(s). Para controle de qualidade interno, entretanto, o último requisito pode ser relevado, mas homogeneidade e estabilidade adequadas são essenciais (INMETRO, 2010).

O objetivo principal deste trabalho é apresentar os dados dos estudos de homogeneidade e estabilidade de curta duração de um projeto piloto de produção de um material de referência de salinomicina na matriz ovo.



MATERIAL E MÉTODOS

2 kg de ovo integral pasteurizado, previamente analisado e constatado a ausência de salinomicina, foi fortificado com 10 mL de solução de salinomicina na concentração de 1 µg/mL. Homogeneizou-se por 1 h. O produto fortificado foi distribuído em recipientes plásticos do tipo “tupperware” e congelado a -70 °C por 12 h e, posteriormente, liofilizado (Liofilizador Liotop, K105, Brasil) por 40 h à temperatura inicial de -99 °C, temperatura final de -102 °C e vácuo a 0,044 mmHg.

As amostras liofilizadas foram trituradas com auxílio de gral e pistilo, homogeneizadas utilizando-se a rotação de um evaporador rotativo (Heidolph, Laborota 4003, Alemanha) com agitação de 25 rpm e vácuo de 600 mmHg, à temperatura ambiente por 1 h.

Para a verificação da ausência de salinomicina na matriz que foi fortificada para os estudos de homogeneidade e estabilidade do material produzido utilizou-se um método analítico baseado na extração com solvente e determinação pela técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) desenvolvida e validada pelo Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos do INCQS/ Fiocruz (SPISSO et al, 2010b).

Para o estudo de homogeneidade utilizou-se 16 amostras selecionadas de forma aleatória, por meio de sorteio. Os dados obtidos foram verificados para *outliers* utilizando o teste de Grubbs e a análise de regressão foi realizada para detectar possíveis tendências a respeito da sequência de enchimento dos frascos ou a sequência analítica. A análise de variância de um fator (ANOVA) foi realizada para estimar a contribuição da incerteza de uma possível heterogeneidade, calculada em função dos valores da média quadrática (MQ) entre os frascos (MQ_{entre}) e dentro dos frascos (MQ_{dentro}), conforme recomendado pela ISO Guia 35.

O estudo de estabilidade de curta duração foi realizado em 2 temperaturas distintas: -20 °C (freezer), 25 °C (ambiente), em um período de trinta dias, utilizando-se o modelo isócrono. Os resultados foram avaliados considerando como valor de referência as concentrações de salinomicina das amostras armazenadas a -70 °C, condição essa em que se acredita não haver nenhum tipo de alteração na amostra e na concentração da salinomicina.

A avaliação foi realizada pela análise de regressão linear simples para verificação da relação entre as duas variáveis, concentração versus tempo. O critério de avaliação da análise de tendência para o estudo de estabilidade, para o modelo linear, é que a inclinação seja insignificante².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação de tendência nos lotes, o valor-P > 0,05 obtido para todos os lotes indica que a regressão é insignificante, e, dessa forma, todos os lotes estão adequados para certificação.

Os resultados das análises de variância com fator único dos lotes estão representados na Tabela 1. O teste F confirmou não haver diferenças significativas entre os resultados, pois apresentaram valores de $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$ ($\alpha = 5\%$), indicando que nenhum grau de heterogeneidade significativa foi detectado nos lotes. Isso demonstra que a variação da concentração de salinomicina na composição das amostras distribuídas nos recipientes foi suficientemente pequena para o objetivo proposto. O valor da incerteza global encontrado para o lote foi de 2,6 %.

Sendo assim, os resultados encontrados foram satisfatórios em relação à homogeneidade da amostra, indicando que os procedimentos realizados no preparo do lote foram adequados para a produção de um material de referência de matriz ovo contendo salinomicina.

Tabela 1 – ANOVA – fator único do estudo de homogeneidade

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1,10	15	0,07	0,41	0,96	1,99
Dentro dos grupos	5,72	32	0,18			
Total	6,82	47				

Os gráficos de tendência das amostras avaliadas para as temperaturas de 25 °C e -20 °C estão ilustrados, respectivamente, no Gráfico 1. A Tabela 2 mostra os valores da inclinação, dos erros-padrão da inclinação e os valores-P extraídos da análise de regressão, assim como os fatores t de Student e o produto da multiplicação do $t_{(0,95; n-2)} \times s(b_1)$, obtidos da análise de regressão dos produzidos e avaliados, respectivamente, para as temperaturas de 25 °C e -20 °C. A ANOVA de fator único confirmou a estabilidade da salinomicina por 30 dias nas temperaturas de -20 °C e 25 °C, pois não houve diferenças estatisticamente significativas nas variâncias.

Gráfico 1 – Tendência das medições em função do tempo para o estudo de estabilidade a 25 °C e -20 °C.

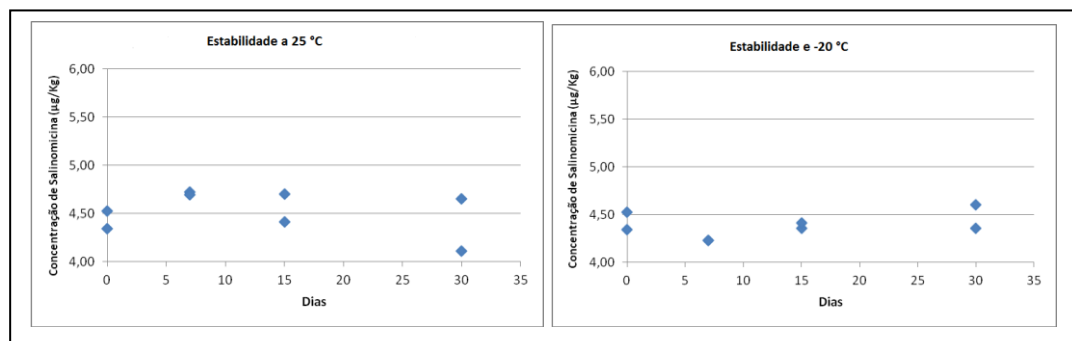




Tabela 2 – Dados obtidos da análise de regressão e avaliação da inclinação do estudo de estabilidade de curta duração a 25°C e -20°C

<i>Parâmetros</i>	25 °C	-20 °C
Inclinação (b_1)	0,005	0,004
Erro-padrão $s(b_1)$	0,007	0,004
Valor-p ($>0,05$)	0,550	0,382
$t_{(0,95; n-2)}$	2,447	2,447
$t_{(0,95; n-2)} \times s(b_1) > b_1 $	0,018	0,010

CONCLUSÃO

Os estudos de homogeneidade demonstraram que os procedimentos e condições de preparação e embalagem dos materiais foram satisfatórios, uma vez que o lote se apresentou homogêneo.

Pelos estudos de estabilidade de curta duração verificou-se que para a preservação da integridade da matriz o material deve ser transportado livre de calor, sendo mantido na faixa de temperatura de 25 °C a -20 °C.

Os resultados obtidos até o momento subsidiam a viabilidade da produção do material de referência de salinomicina em matriz ovo, que poderá se tornar um material de referência candidato à certificação.

REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). ISO/IEC 17025:2005. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração; 2006.
2. Associação Brasileira De Normas Técnicas (ABNT). ISO Guia 35. Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação; 2012.



3. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). ISO Guia 31. Conteúdo de certificados de materiais de referência; 2004.
4. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). ISO Guia 34. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência; 2004.
5. Spisso BF, Pereira MU, Ferreira RG, Monteiro MA, Costa RP, Cruz TA, Nóbrega AW. Pilot survey of hen eggs consumed in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for polyether ionophores, macrolides and lincosamides residues. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 2010a; 3(4):212–219.
6. Dorne JLCM, Fernández-Cruz ML, Bertelsen U, Renshaw DW, Peltonem 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. Appl. Pharmacol.* 2013; 270:196–280.
7. Nogueira VA, França TN, Vargas P. Intoxicação por antibióticos ionóforos em animais. *Pesq. Vet. Bras.* 2009; 29(3):191-197.
8. European Union. Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) No. 124/2009 of 10 February 2009 setting maximum levels for the presence of coccidiostats or histomonostats in food resulting from the unavoidable carry-over of these substances in non-target feed. *Off J Eur Commun.* 2009. L40:7-11.
9. Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO). Orientação para a Seleção e Uso de Materiais de Referência – DOQ-CGCRE-016, Revisão 02 – 02/2010. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-16_02.pdf>. Acesso em: 01 mar 2014.
10. Spisso BF, Ferreira RG, Pereira MU, Monteiro MA, Cruz TA, Costa RP, Lima AMB, Nóbrega AW. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. ***Analytica Chimica Acta***, 2010b; 682:82–92.