

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Bianca Figueiredo de Mendonça Pereira

**RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS MACROLÍDEOS EM FÓRMULAS
INFANTIS: VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA
EXPOSIÇÃO DIETÉTICA**

Rio de Janeiro

2019

Bianca Figueiredo de Mendonça Pereira

RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS MACROLÍDEOS EM FÓRMULAS INFANTIS:
VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO
DIETÉTICA

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Bernardete Ferraz Spisso

Rio de Janeiro
2019

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Pereira, Bianca Figueiredo de Mendonça

RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS MACROLÍDEOS EM FÓRMULAS INFANTIS: VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DIETÉTICA. / Bianca Figueiredo de Mendonça Pereira. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

142 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Orientadora: Dra Bernardete Ferraz Spisso.

1. Fórmula Infantil. 2. Medicamentos Veterinários. 3. Macrolídeos. 4. LC - MS/MS. 5. QuEChERS alcalino. I. Título.

RESIDUES OF MACROLIDE ANTIMICROBIALS IN INFANT FORMULAS: VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD AND DIETARY EXPOSURE ASSESSMENT.

Bianca Figueiredo de Mendonça Pereira

RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS MACROLÍDEOS EM FÓRMULAS
INFANTIS: VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO
DIETÉTICA

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado Acadêmico do Programa de
Pós-Graduação em Vigilância Sanitária,
do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde, da Fundação
Oswaldo Cruz, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Carlos Adam Conte Junior (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ)

Bianca Ramos Marins Silva (Doutora)
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO)

André Victor Sartori (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ)

ORIENTADORA

Bernardete Ferraz Spisso (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ)

Dedico este trabalho à minha família, que
foi meu incentivo e minha força.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me ilumina e abençoa em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe Terezinha e ao meu pai Itamar (*in memoriam*) pelo amor incondicional e dedicação.

Ao INCQS pela oportunidade de me aprofundar na minha formação por meio do mestrado.

À Dra Bernardete Ferraz Spisso, minha orientadora, por todos os ensinamentos, toda paciência, generosidade e dedicação.

Às queridas Mararlene e Rosana pela grande cooperação e companheirismo ao longo de todo o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos companheiros de laboratório Jônatas e Felipe e a todos os amigos do Departamento de Química pelo apoio e incentivo.

À Cristine Almeida pela parceria na aquisição das fórmulas infantis.

À minha irmã Cíntia, ao meu cunhado Gledson e ao meu sobrinho e afilhado Davi, a melhor família que eu poderia ter, sempre me dando suporte e atenção.

A todos os meus amigos, ao Fábio e aos meus familiares que estiveram presentes durante a realização deste trabalho pelo companheirismo e incentivo.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A resistência aos antimicrobianos (RAM) é considerada um problema de saúde pública global e a Organização Mundial de Saúde (OMS) procura estimular a reflexão e a ação política para combatê-la. A presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos pode levar à exposição prolongada a estas substâncias e contribuir para o desenvolvimento da RAM. Os macrolídeos são antimicrobianos classificados pela OMS como antimicrobianos criticamente importantes de maior prioridade para a saúde humana e devem ser contemplados em avaliações de risco e gestão estratégica de risco para conter a RAM. O objetivo deste trabalho foi avaliar a exposição dietética de lactentes aos resíduos de macrolídeos por meio do consumo de fórmulas infantis. Um método analítico foi otimizado e validado como método quantitativo para eritromicina, espiramicina, oleandomicina e tilosina e qualitativo de confirmação para tilmicosina para determinação em fórmulas infantis empregando o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). Os limites de detecção variaram entre 0,04 e 0,37 ng/mL e os limites de quantificação entre 0,15 e 1,22 ng/mL. O método analítico validado foi aplicado para a análise de 30 amostras de fórmulas infantis para avaliação da ocorrência dos resíduos dos 5 antimicrobianos pesquisados. Em 50% das amostras foram encontrados resíduos apenas de espiramicina, em 3,3% resíduos de tilmicosina e 23,3% das amostras apresentaram resíduos de espiramicina e tilmicosina simultaneamente. As concentrações para espiramicina variaram de 0,363 ng/mL a 1,34 ng/mL. Todas as amostras que apresentaram resíduos de espiramicina e tilmicosina não estavam conformes com a legislação brasileira. A partir dos resultados da avaliação de ocorrência foi realizada a estimativa da exposição dietética de lactentes aos 5 resíduos de macrolídeos analisados. Nenhuma das estimativas de exposição excedeu o valor estabelecido de ingestão diária admissível (IDA), resultado que não sugere uma preocupação potencial.

Palavras-chave: Fórmula Infantil. Macrolídeos. Ocorrência. Medicamentos Veterinários. LC-MS/MS. QuEChERS alcalino.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) is considered a global public health problem and the World Health Organization (WHO) seeks to stimulate reflection and political action to combat it. The presence of antimicrobial residues in food can lead to prolonged exposure to these substances and contribute to the development of AMR. Macrolides are antimicrobials classified by WHO as critically important antimicrobials of higher priority for human health and should be contemplated in risk assessments and strategic risk management to contain AMR. The objective of this study was to evaluate the dietary exposure of infants to macrolide residues through the consumption of infant formulas. An analytical method was optimized and validated as a quantitative method for erythromycin, spiramycin, oleandomycin and tylosin and qualitative confirmatory for tilmicosin for determination in infant formulas using QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) and high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The limits of detection ranged from 0.04 to 0.37 ng/mL and the quantification limits ranged from 0.15 to 1.22 ng/mL. The validated analytical method was applied for the analysis of 30 samples of infant formulas to evaluate the occurrence of residues of the 5 investigated antimicrobials. Spiramycin residues were found in 50% of the samples, tilmicosin residues in 3.3% and 23.3% of the samples showed spiramycin and tilmicosin residues simultaneously. The concentrations for spiramycin ranged from 0.363 ng/mL to 1.34 ng/mL. All samples showing spiramycin and tilmicosin residues were not compliant with the Brazilian legislation. From the results of the occurrence evaluation, the dietary exposure of infants to the 5 macrolide residues analyzed was estimated. None of the exposure estimations exceeded the established acceptable daily intake (ADI), a result that does not suggest potential concern.

Keywords: Infant Formula. Macrolides. Occurrence. Veterinary drugs. LC-MS / MS. Alkaline QuEChERS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Análise do risco	23
Figura 2	Comparação entre o modelo utilizando a IDMT (a) e a IDE (b) para avaliação dos dados de resíduos e recomendação de LMRs pelo JECFA.....	30
Figura 3	Relação entre o LMR e a concentração mediana	31
Figura 4	Distribuição de frequência	33
Figura 5	Distribuição de probabilidade contínua	33
Figura 6	Estrutura química dos macrolídeos	41
Figura 7	Fórmulas estruturais da eritromicina (a), oleandomicina (b), espiramicina (c), tilosina (d) e tilmicosina (e)	44
Gráfico 1	Consumo de fórmulas infantis por crianças brasileiras	46
Quadro 1	Cálculo de dieta para lactentes utilizando fórmulas lácteas industrializadas	47
Figura 8	Fluxograma do método QuEChERS desenvolvido para análise de leite	68
Figura 9	Cromatograma do analito TILM utilizando o método com <i>dwell time</i> de 50 ms e tempo de corrida de 20 min (A) e <i>dwell time</i> de 100 ms e tempo de corrida de 15 min (B)	95
Figura 10	Cromatograma de íons totais obtido para uma amostra de fórmula infantil fortificada no início do procedimento a 10 ng/mL para espiramicina, oleandomicina, eritromicina, tilosina, tilmicosina e roxitromicina	96
Figura 11	Cromatograma de íon extraído obtido para uma amostra de fórmula infantil fortificada no início do procedimento a 10 ng/mL para tilmicosina	97
Figura 12	Curvas dos analitos ERI, ESP, OLE e TIL no diluente e nas 6 diferentes matrizes sobrepostas	100
Figura 13	Diagrama de Box-Whisker das curvas no diluente no primeiro dia de experimento para ERI (a), ESP (b), OLE (c), TIL (d) e TILM (e) .	102
Figura 14	Valor de p gerado pela planilha <i>Parameter Estimates</i> do software <i>Statistica</i> ® 8.0 para avaliação do melhor ajuste do modelo para o	

	analito ERI	106
Gráfico 2	Ocorrência de macrolídeos nas fórmulas infantis 1 e 2	114
Figura 15	Cromatograma de íons extraídos da amostra 011/2018, identificada e confirmada para ESP e TILM	115
Figura 16	Cromatograma de íons extraídos da amostra 016/2018, identificada e confirmada apenas para ESP	116
Figura 17	Cromatograma de íons extraídos da amostra 023/2018, identificada e confirmada apenas para TILM	117
Figura 18	Resultados dos critérios de razão de íons (a) e tempo de retenção relativo (b) do analito ESP calculados para a amostra controle fortificada em CC α no início do procedimento no primeiro dia de experimento	118
Figura 19	Cromatogramas dos 5 analitos da amostra controle fortificada no CC α no início do procedimento e amostra controle branca de fórmula infantil	119
Gráfico 3	Tendência de estimativa de exposição diária à ESP (mg/kg) de acordo com a idade do lactente e o tipo de fórmula infantil para amostras do fabricante 1, marca A (a), fabricante 1, marca B (b), fabricante 2, marca A (c), fabricante 3, marca A (d) e fabricante 3, marca B (e)	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dieta modelo	34
Tabela 2	Exemplo de guia de referência para preparo de uma fórmula infantil para lactentes e de seguimento para lactentes (0 a 12 meses)	47
Tabela 3	Panorama da ocorrência de antimicrobianos em fórmulas infantis.....	50
Tabela 4	Características de desempenho necessárias para cada tipo de método analítico	53
Tabela 5	Lista de padrões utilizados	60
Tabela 6	Lista de fórmulas infantis	63
Tabela 7	Parâmetros do LC - MS/MS para os analitos alvo e padrão interno ROX para análise na matriz leite	64
Tabela 8	Parâmetros do LC - MS/MS para os analitos alvo e padrão interno ROX para análise na matriz fórmula infantil	67
Tabela 9	Massa (g) de fórmulas infantis para reconstituição com 30 mL de água deionizada	82
Tabela 10	Tolerância máxima permitida para as intensidades relativas de sinal de íons para LC-MS ⁿ	85
Tabela 11	Guias de referência para preparos das fórmulas infantis tipo 1 e 2 presentes nos rótulos	87
Tabela 12	Massa (g) correspondente a uma medida rasa	88
Tabela 13	Peso médio dos padrões de crescimento para meninas e meninos, conforme idade do lactente (0 a 11 meses)	88
Tabela 14	RSDs obtidos para avaliação de efeito matriz relativo	92
Tabela 15	Comparação das médias das áreas e desvios padrão relativos (%RSD) dos analitos (1 ^a transição) quando utilizado o método com <i>dwell time</i> de 50 ms e o método com <i>dwell time</i> de 100 ms	93
Tabela 16	Comparação entre os resultados obtidos para os analitos (áreas da 1 ^a transição) com a análise utilizando método analítico com tempo de corrida de 20 min e com o método analítico com tempo	

	de corrida de 15 min	94
Tabela 17	RSDs obtidos entre os coeficientes angulares de curvas de calibração na matriz e em solução padrão para avaliação de efeito matriz relativo	99
Tabela 18	Resultados para o intervalo linear instrumental considerando os três dias de experimento	103
Tabela 19	Valores de p considerando regressão linear de primeira ordem e valores de p considerando modelo polinomial de segunda ordem para os três dias de experimentos.....	104
Tabela 20	Dados das curvas de calibração com fortificação no início do procedimento na matriz representativa 012/2018	107
Tabela 21	Resultados da recuperação, repetibilidade, precisão intermediária, CC α , CC β , incerteza, LOD e LOQ, n = 18, exceto os valores identificados com (b) sobrescrito	109
Tabela 22	Exemplos de desvio padrão relativo em condições de repetibilidade (RSD _r) para métodos quantitativos referentes a um intervalo de concentrações da substância a analisar	110
Tabela 23	Exemplos de desvio padrão relativo em condições de reprodutibilidade (RSD _R) para métodos quantitativos referentes a um intervalo de concentrações da substância a analisar	111
Tabela 24	Veracidade mínima (expressa como tendência ou recuperação) dos métodos quantitativos segundo a União Europeia	111
Tabela 25	Veracidade mínima (expressa como tendência ou recuperação) dos métodos quantitativos segundo o <i>Codex Alimentarius</i>	111
Tabela 26	Resultados da avaliação da exposição dietética diária de lactentes de 0 a 11 meses (em mg/kg e % de IDA) considerando o primeiro cenário de consumo, utilizando o valor mediano e o valor mais alto de concentração dos resíduos (pior caso) entre lotes das diferentes marcas e sem distinção de marcas (global).....	123
Tabela 27	Comparação geral, considerando todas as marcas, entre as avaliações das exposições dietéticas diárias estimadas pela concentração mediana e pelo pior caso (maior concentração verificada entre os lotes das amostras) no primeiro e segundo	

cenários de consumo	127
---------------------------	-----

LISTA DE SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARfD	Dose Aguda de Referência
CC α	Limite de Decisão
CC β	Capacidade de Detecção
CCRVDF	<i>Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food</i> , Comitê do <i>Codex Alimentarius</i> sobre Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos
CIPAN	Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial
EFSA	European Food Safety Authority, Autoridade Europeia para Segurança Alimentar
ENANI	Estudo Nacional de Aleitamento e Nutrição Infantil
ERI	Eritromicina
ESP	Espiramicina
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> , Organização para Alimentação e Agricultura
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Agência Americana para Alimentos e Medicamentos
GEADE	Exposição Dietética Aguda Estimada Global
GECDE	Exposição Dietética Crônica Estimada Global
GEMS/Food	Sistema de Monitoramento Global do Meio Ambiente da OMS – Programa de Monitoramento e Avaliação de Contaminação em Alimentos
H ₂ O	Água
IDA	Ingestão Diária Admissível
IDE	Ingestão Diária Estimada
IDMT	Ingestão Diária Máxima Teórica
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

JECFA	<i>Joint FAO/WHO of Expert Committee on Food Additives</i> , Comitê Misto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares e Contaminantes
K ₂ CO ₃	Carbonato de potássio
LC-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
LMR	Limite Máximo de Resíduo
LMDR	Limite Mínimo de Desempenho Requerido
LMT	Limite Máximo Tolerável
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MMQP	Método dos Mínimos Quadrados Ponderados
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i> , dose mais alta que não produz efeito adverso
OIE	<i>World Organisation for Animal Health</i> , Organização Mundial para Saúde Animal
OLE	Oleandomicina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAN-BR	Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única
PAMVet	Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
POP	Procedimento Operacional Padrão
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> (Rápido, Fácil, Econômico, Robusto e Seguro)
RAM	Resistência aos Antimicrobianos
RSD	Desvio Padrão Relativo
RSD _r	Desvio padrão relativo em condições de repetibilidade

RSD _R	Desvio padrão relativo em condições de reprodutibilidade
SAR	<i>Structure – Activity Relationship</i> , Relação Estrutura Molecular e Atividade
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
TIL	Tilosina
TILM	Tilmicosina
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
UHT	<i>Ultra high temperature</i> (Ultrapasteurização)
VISA	Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Apresentação do tema e do problema	19
1.2	Vigilância Sanitária no Brasil	20
1.3	Análise do risco químico em alimentos	22
1.3.1	Avaliação do risco	23
1.3.1.1	<i>Identificação do perigo</i>	23
1.3.1.2	<i>Caracterização do perigo</i>	24
1.3.1.3	<i>Avaliação da exposição</i>	24
1.3.1.4	<i>Caracterização do risco</i>	24
1.3.2	Gerenciamento do risco	25
1.3.3	Comunicação do risco	25
1.4	Análise do risco de resíduos de produtos de uso veterinário em alimentos	25
1.5	Avaliação da exposição a produtos químicos na alimentação.	26
1.5.1	Dados de concentração da substância química nos alimentos	27
1.5.2	Dados de consumo	27
1.5.3	Peso corporal	28
1.6	Métodos para avaliação da exposição	28
1.7	Abordagens atuais de metodologias para avaliação de exposição dietética para resíduos de produto de uso veterinário	34
1.7.1	Avaliação da exposição aguda e crônica	35
1.8	A resistência aos antimicrobianos (RAM) como um risco global	37
1.9	Antimicrobianos criticamente importantes para a saúde	40
1.10	Resíduos de antimicrobianos macrolídeos em alimentos	42
1.11	Fórmulas infantis produzidas a partir de leite bovino	44
1.12	Regulamentações para resíduos e contaminantes em fórmulas infantis	47
1.13	Métodos analíticos e dados de ocorrência de resíduos de antimicrobianos em fórmulas infantis	49

1.14	Método QuEChERS (<i>quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i>) para resíduos de macrolídeos em leite e fórmulas infantis	51
1.15	Validação de método analítico para a determinação de produtos de uso veterinário em alimentos	52
1.15.1	Seletividade	54
1.15.2	Efeito matriz	54
1.15.3	Linearidade	54
1.15.4	Recuperação / Veracidade	55
1.15.5	Precisão	55
1.15.6	Limite de decisão (CC α) e Capacidade de detecção (CC β)	55
1.15.7	Robustez	56
1.15.8	Ampliação do escopo do procedimento analítico validado	56
1.15.9	Abordagens alternativas de validação	56
1.16	Justificativa	57
2	OBJETIVOS	59
2.1	Objetivo geral	59
2.2	Objetivos específicos	59
3	METODOLOGIA	60
3.1	Materiais	60
3.1.1	Padrões	60
3.1.2	Reagentes e solventes	60
3.1.3	Equipamentos e acessórios	61
3.2	Preparo de soluções estoque	62
3.3	Aquisição e preparo das amostras	62
3.4	Condições cromatográficas e espectrométricas do método desenvolvido e validado para análise de macrolídeos em leite (LC-MS/MS)	64
3.5	Condições cromatográficas e espectrométricas do método desenvolvido e validado para análise de macrolídeos em fórmulas infantis	65
3.6	Método de preparo de amostra QuEChERS para análise de resíduos de macrolídeos em leite e fórmulas infantis	68

3.7	Avaliação da aplicabilidade para fórmulas infantis do método analítico desenvolvido e validado em leite por Costa (2014)	69
3.7.1	Avaliação da linearidade	70
3.7.2	Avaliação da seletividade e do efeito matriz relativo	71
3.8	Otimização do método analítico para fórmulas infantis tipos 1 e 2	71
3.9	Validação do método analítico para fórmulas infantis tipos 1 e 2	72
3.9.1	Preparo de soluções padrão e amostras	73
3.9.1.1	<i>Soluções padrão em ACN:H₂O (1:3, v/v) para fortificação no final do procedimento de extração e curva no diluente</i>	<i>73</i>
3.9.1.2	<i>Soluções padrão em ACN:H₂O (1:3, v/v) para fortificação no início do procedimento de extração</i>	<i>74</i>
3.9.1.3	<i>Preparo de amostras brancas de reagentes</i>	<i>74</i>
3.9.1.4	<i>Preparo de amostras brancas de fórmulas infantis não contaminadas (branco)</i>	<i>75</i>
3.9.1.5	<i>Preparo de amostras de fórmulas infantis fortificadas no final do procedimento de extração</i>	<i>75</i>
3.9.1.6	<i>Preparo de amostras de fórmulas infantis fortificadas no início do procedimento de extração</i>	<i>75</i>
3.9.2	Seletividade (incluindo efeito matriz relativo)	76
3.9.3	Intervalo de medição e intervalo linear instrumental.....	77
3.9.4	Linearidade (intervalo linear do método), sensibilidade e efeito matriz absoluto	77
3.9.5	Recuperação, repetibilidade, precisão intermediária, CC α , CC β , incerteza de medição, LOQ e LOD.....	79
3.9.6	Verificação dos valores de CC α e CC β	80
3.9.6.1	<i>Preparo das amostras fortificadas no início do procedimento de extração na concentração de CCα</i>	<i>80</i>
3.9.6.2	<i>Preparo das amostras fortificadas no início do procedimento de extração na concentração de CCβ</i>	<i>81</i>
3.9.6.3	<i>Preparo das soluções controle nas concentrações de CCα e CCβ ..</i>	<i>81</i>
3.10	Avaliação da ocorrência de espiramicina, eritromicina,	

	oleandomicina, tilosina e tilmicosina em fórmulas infantis para lactentes (tipo 1) e de seguimento para lactentes (tipo 2)	81
3.10.1	Preparo das amostras	82
3.10.2	Preparo da curva de calibração	82
3.10.3	Preparo da amostra fortificada no início do procedimento de extração na concentração de CC α	83
3.10.4	Preparo da amostra fortificada no final do procedimento de extração na concentração de CC α	83
3.10.5	Identificação e quantificação dos analitos	84
3.11	Avaliação da exposição dietética	86
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
4.1	Avaliação da aplicabilidade do método em fórmulas infantis	90
4.1.1	Avaliação da linearidade	90
4.1.2	Avaliação da seletividade e do efeito matriz relativo	91
4.2	Otimização do método analítico para fórmulas infantis tipos 1 e 2	92
4.3	Validação do método analítico para fórmulas infantis tipos 1 e 2.....	97
4.3.1	Seletividade (incluindo efeito matriz relativo)	98
4.3.2	Intervalo de medição e intervalo linear instrumental	101
4.3.3	Linearidade (intervalo linear do método), sensibilidade e efeito matriz absoluto	105
4.3.3.1	<i>Linearidade (intervalo linear do método) e sensibilidade</i>	<i>105</i>
4.3.3.2	<i>Efeito matriz absoluto</i>	<i>107</i>
4.3.4	Recuperação, repetibilidade, precisão intermediária, CC α , CC β , incerteza de medição, LOQ e LOD	108
4.3.5	Verificação dos valores de CC α e CC β	113
4.4	Avaliação da ocorrência de espiramicina, eritromicina, oleandomicina, tilosina e tilmicosina em fórmulas infantis para lactentes (tipo 1) e de seguimento para lactentes (tipo 2)	114
4.5	Avaliação da exposição dietética	122
5	CONCLUSÃO	130
	REFERÊNCIAS	131

1 INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do tema e do problema

O uso de antimicrobianos na saúde humana e animal, seja na produção de alimentos ou como medida inapropriada para controlar a disseminação de infecções ameaça a saúde pública global devido ao crescimento da resistência aos antimicrobianos (RAM) desenvolvida pelos microrganismos, fazendo com que seja cada vez mais frequente o aparecimento de infecções sem alternativas de tratamento e multirresistentes (OMS, 2012). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os antimicrobianos criticamente importantes para a saúde humana que devem ser priorizados nas estratégias de combate à RAM são: cefalosporinas de 3^a, 4^a e 5^a geração, macrolídeos, aminoglicosídeos, ansamicinas, carbapenêmicos, glicopeptídeos, gliciliclinas, lipopeptídeos, macrolídeos e cetolídeos, monobactâmicos, oxazolidinonas, penicilinas, derivados do ácido fosfórico, polimixinas, quinolonas e medicamentos utilizados para tratar exclusivamente a tuberculose ou outras doenças micobacterianas. Os macrolídeos, classificados como criticamente importantes para a saúde humana são amplamente usados em animais produtores de alimentos, inclusive como aditivos zootécnicos, e sabe-se que podem selecionar *Campylobacter* spp resistentes, sendo uma das poucas alternativas terapêuticas para infecções por essa bactéria, especialmente em crianças, para as quais não se recomendam as quinolonas (WHO, 2017a).

A garantia da qualidade dos alimentos provenientes de animais produtores se insere no contexto do combate à RAM uma vez que os resíduos de medicamentos veterinários, representados principalmente pelos antimicrobianos, são um dos principais problemas de contaminação destes produtos (BEYENE, 2016).

A fórmula infantil é um substituto do leite humano e uma das formas de produção é utilizar como base o leite de vaca (CODEX ALIMENTARIUS, 2007). Podendo ser a única fonte alimentícia para muitos lactentes durante os seis primeiros meses de vida, este produto deve ser livre de resíduos e contaminantes para garantir uma nutrição segura a esse grupo vulnerável da população (RODRIGUEZ et al, 2008). A concentração máxima de resíduos (mg/kg ou µg/kg de peso) legalmente permitida em um determinado alimento é estabelecida através do valor do limite máximo de resíduos (LMR). Este valor considera o preceito do risco à

saúde e é definido através de uma avaliação da exposição na qual o cálculo da exposição dietética utilizando o LMR que se deseja atribuir não deve ultrapassar o valor da ingestão diária admissível (IDA) (FAO/WHO, 2016a). Apesar da importância do estabelecimento do LMR para determinados produtos ainda não existem LMRs para resíduos de antimicrobianos específicos para fórmulas infantis nas legislações atuais do Brasil, Estados Unidos da América, União Europeia, Japão e nas recomendações do *Codex Alimentarius*.

Para a determinação de resíduos de antimicrobianos em alimentos são necessários métodos analíticos adequados. A validação tem como propósito confirmar que o método analítico desenvolvido responde à sua proposta com a confiabilidade dos resultados das medições assegurada (BRASIL, 2011e).

As agências reguladoras de cada país devem fazer as tomadas de decisão quanto às suas ações sobre determinado produto ou serviço embasadas em análises de risco cujo preceito é a proteção da saúde humana. A análise do risco é composta por avaliação do risco, gerenciamento do risco e comunicação do risco, sendo a primeira subdividida em identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco. A avaliação da exposição é o principal componente para quantificar um risco e pode ter diferentes objetivos, como uma avaliação da exposição num momento pré-regulação (anterior à aprovação para uso) ou pós-regulação (posterior à aprovação para uso). O estabelecimento de LMR é um exemplo de avaliação de exposição pré-regulação e o uso de dados de monitoramento e vigilância é um exemplo de avaliação pós-regulação (FAO/WHO, 2009a; FAO/WHO, 2009b).

O objetivo deste trabalho foi validar um método analítico capaz de detectar e/ou quantificar os macrolídeos eritromicina, espiramicina, oleandomicina, tilmicosina e tilosina em fórmulas infantis e gerar informações através da avaliação da exposição a respeito do possível risco de exposição dietética de lactentes, que fazem uso de fórmulas infantis de 0 a 12 meses produzidas a partir de leite de vaca, aos resíduos destes antimicrobianos.

1.2 Vigilância Sanitária no Brasil

Uma característica do consumo de mercadorias, bens e serviços, de tecnologias médicas e de serviços de saúde é de não se basear em escolhas livres

e conscientes. O modo de produção capitalista, cujo objetivo é o lucro, torna este consumo discordante das reais necessidades das pessoas. Como resultado, são gerados muitos riscos e danos à saúde do indivíduo e da coletividade, para o meio ambiente e à economia do consumidor. As ações de Vigilância Sanitária (VISA) se inserem neste contexto devido à vulnerabilidade do consumidor, resultando na necessidade de controle das relações de produção e consumo através da criação de medidas para proteger a saúde coletiva (COSTA; ROZENFELD, 2000).

A VISA constitui uma das práticas em saúde com ações de prevenção e controle de riscos, proteção e promoção da saúde das pessoas e da coletividade. Estas ações abrangem objetos diversificados que possuem risco intrínseco, podendo ser ampliada à medida que se aumenta a produção de bens e serviços, sejam destinados às necessidades fundamentais ou supérfluos (COSTA, 2009).

Define-se VISA por “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde” (BRASIL, 1990). A regulação, o controle e a fiscalização das relações de produção e consumo de bens e serviços relacionados à saúde são instrumentos utilizados pela VISA para reduzir o risco sanitário ligado à utilização destes produtos e serviços (SILVA; LANA, 2014).

A VISA no Brasil utiliza o poder de polícia para regular as relações de produção e consumo elaborando normas jurídicas e técnicas e na fiscalização de seu cumprimento (COSTA; ROZENFELD, 2000). O objetivo de tais regulações é tornar a vida mais segura, eliminando ou reduzindo a exposição a certas substâncias, situações/procedimentos ou profissionais desqualificados considerando sempre a ótica do risco à saúde. Há pelo menos cinco áreas da administração pública comprometidas a controlar riscos à saúde no Brasil como a Saúde, a Agricultura, o Meio Ambiente, a Indústria e Comércio e a Nuclear. Todas essas áreas possuem um sistema de regulação amplamente relacionado com o sistema de VISA, tanto pela função de regulamentação e controle quanto pela possibilidade de superposição de programas ou atividades em função de seus objetivos (LUCCHESI, 2001).

O sistema de regulação sanitária brasileira e todo o trabalho da VISA deve se orientar a partir de análises do risco aplicadas a casos específicos, considerando as questões políticas, econômicas e sociais. Esta avaliação pode se mostrar de forma

simples quando a relação causa/dano é percebida de forma clara e rápida, porém pode resultar em vários elementos de incerteza quando envolve pequenos riscos ou quando a exposição é excessivamente longa (LUCCHESI, 2001).

1.3 Análise do risco químico em alimentos

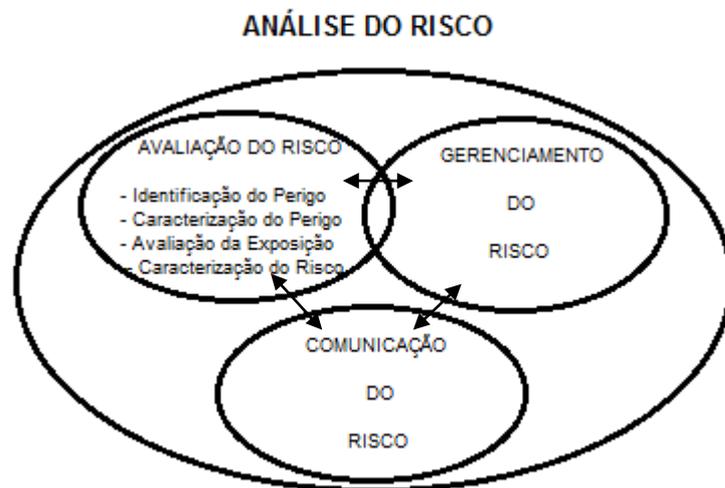
Podemos classificar risco no campo da saúde como a probabilidade de ocorrência de um evento nocivo em um determinado período de observação podendo ser referenciado como fenômeno coletivo (BRASIL, 2008a).

Os alimentos não se constituem somente de substâncias essenciais para a saúde humana, mas também de substâncias químicas potencialmente tóxicas que em excesso podem significar risco à saúde. O risco na dieta dependerá do grau de toxicidade da substância e da exposição da população (JARDIM; CALDAS, 2009).

O *Codex Alimentarius* consiste em normas, diretrizes e códigos de práticas que são adotadas pela Comissão do Codex Alimentarius, criada pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que constitui a parte central do Programa Conjunto FAO/OMS de padrões alimentares cujo objetivo é orientar e promover a elaboração e estabelecimento de definições e requisitos para os alimentos. Os padrões são para todos os principais alimentos destinados ao consumidor, sejam processados, semi-processados ou crus. Os aspectos de segurança alimentar e saúde dos padrões e textos relacionados do *Codex* são baseados em análises de risco (FAO/WHO, 2016a).

O principal preceito que define a análise de risco é a proteção da saúde humana. O paradigma da análise de risco se caracteriza pela separação de seus componentes (avaliação do risco, gerenciamento do risco e comunicação do risco), porém com a interação de seus responsáveis (**Figura 1**) (FAO/WHO, 2009a).

Figura 1- Análise do risco



Fonte: (Modificado de FAO/WHO, 2009a).

1.3.1 Avaliação do risco

A avaliação do risco é o principal componente científico da análise de risco. Consiste em quatro etapas que tem como objetivo fornecer a base científica para os gerentes de risco efetuarem as tomadas de decisão. Além disso, essa avaliação pode fornecer uma estimativa de probabilidade de dano (FAO/WHO, 2009a).

1.3.1.1 Identificação do perigo

O perigo é caracterizado como qualquer agente biológico, químico ou físico presente no alimento, ou condição do alimento, que possui potencial de causar efeito adverso à saúde (FAO/WHO, 2016a).

Para a identificação do perigo podem ser utilizadas fontes de informações como relação estrutura molecular e atividade (*Structure – Activity Relationship – SAR*), testes *in vitro*, estudos com animais e com seres humanos. O SAR é utilizado quando não há dados toxicológicos para a substância que se pretende estudar ou quando o nível de exposição humana é muito baixo (JARDIM; CALDAS, 2009).

1.3.1.2 *Caracterização do perigo*

Nesta etapa normalmente, são geradas informações sobre a relação dose administrada (exposição) e o efeito adverso, uma vez que há uma descrição qualitativa e quando possível quantitativa das propriedades da substância (FAO/WHO, 2009a). Estudos *in vivo* (animais de laboratório) são a principal fonte de informações dessa relação dose-resposta de substâncias presentes nos alimentos (JARDIM; CALDAS, 2009). Nesta etapa podem ser estabelecidos também valores de orientação, como por exemplo, ingestão diária admissível (IDA) e dose aguda de referência (ARfD) (FAO/WHO, 2009a).

1.3.1.3 *Avaliação da exposição*

Consiste na avaliação da exposição de um organismo, sistema ou população a um agente levando em consideração a concentração da substância quantificada no alimento (mg/kg), o consumo do alimento (kg) e o peso corpóreo (kg) individual ou da população (JARDIM; CALDAS, 2009; FAO/WHO, 2009a).

1.3.1.4 *Caracterização do risco*

É a determinação qualitativa e quando possível quantitativa da probabilidade de ocorrência de efeitos adversos conhecidos e potenciais que um agente pode causar, em condições de exposições definidas, em um organismo, sistema ou população. Informações como a natureza, magnitude e relevância do risco devem estar presentes na caracterização do risco considerando diferentes cenários de exposição que possibilite estimativas de risco potencial para a saúde. Devido à falta de alguns dados científicos, podem ocorrer algumas incertezas a respeito do risco potencial de uma determinada substância ou agente e essa informação precisa ser mencionada nesta fase (FAO/WHO, 2009a).

1.3.2 Gerenciamento do risco

Neste momento, as agências reguladoras devem tomar as decisões considerando o preceito principal de proteção da saúde humana, além de fatores políticos, sociais e econômicos (JARDIM; CALDAS, 2009; FAO/WHO, 2009a).

1.3.3 Comunicação do risco

Durante todo o processo da análise de risco deve haver o intercâmbio de informações entre avaliadores de risco, gerentes de risco, consumidores, indústria, comunidade acadêmica e partes interessadas (FAO/WHO, 2009a).

1.4 Análise do risco de resíduos de produtos de uso veterinário em alimentos

No âmbito do *Códex Alimentarius*, o *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), embora não faça parte oficialmente da sua estrutura, fornece pareceres científicos independentes para os peritos das Comissões Especializadas. O comitê deve usar o processo de avaliação de risco para estabelecer a dose aguda de referência (ARfD) e a ingestão diária máxima admissível (IDA) para resíduos de produtos de uso veterinário, além de propor limites máximos de resíduos (LMRs) e responder perguntas do comitê do *Codex* sobre Resíduos de Produtos de uso Veterinário (*Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods*, CCRVDF) (FAO/WHO, 2016a).

O *Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods* (CCRVDF), fornece orientações sobre gerenciamento de risco à Comissão do *Codex Alimentarius* relativas a resíduos de medicamentos veterinários. Suas decisões de gestão de risco são baseadas nos pareceres do JECFA. A Comissão do *Codex Alimentarius* estabelece as responsabilidades do CCRVDF e JECFA e suas interações (FAO/WHO, 2016a).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pela condução da avaliação do risco da exposição da população a resíduos e contaminantes em alimentos (BRASIL, 2017a). Nos Estados Unidos, a Agência Americana para Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA), utiliza a avaliação do risco para garantir que as decisões no âmbito regulatório, que

visa prevenir a contaminação de alimentos, sejam baseadas em ciência (FDA, 2011). A Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority*, EFSA) é um avaliador de risco que conduz pareceres que são bases para a política e legislações europeias relacionadas a segurança alimentar (EFSA, 2016).

1.5 Avaliação da exposição a produtos químicos na alimentação

Ao se iniciar uma avaliação da exposição deve-se definir claramente alguns pontos para possibilitar a escolha da maneira correta de se levantar os dados de consumo e concentração, como o objetivo da avaliação (pré-registro ou pós-registro), o tipo da substância a se avaliar, a toxicidade e os efeitos benéficos da substância de acordo com a exposição da população, diferenças de subgrupos e tipo de estimativa de exposição necessária (determinística ou probabilística) (FAO/WHO, 2009b).

As avaliações de exposição podem ser realizadas para exposições agudas, que se caracterizam por exposições curtas, de até 24 horas, ou por exposições crônicas, exposição a longo prazo na qual é avaliada a exposição média diária ao longo da vida. (FAO/WHO, 2005). Para o cálculo da exposição dietética é usada uma equação geral para a exposição aguda e a crônica (**Equação 1**):

$$\text{Exposição} = \frac{\sum (\text{concentração do resíduo no alimento (mg/Kg)} \times \text{consumo (Kg)})}{\text{Peso corporal (kg)}} \quad (1)$$

O resultado da estimativa da exposição pode então ser comparado com valores de orientação, se disponível para o produto químico, como parte da caracterização do risco (FAO/WHO, 2009b).

Algumas substâncias químicas podem apresentar efeitos adversos quando consumidas em doses baixas após exposição prolongada (crônica). Por isso uma exposição dietética média deve ser comparada a um valor de orientação crônico. Normalmente a concentração média ou mediana é utilizada considerando que este valor representa a média de longo prazo das concentrações verdadeiramente encontradas combinadas com altos percentis ou consumo total do alimento (FAO/WHO, 2009b).

1.5.1 Dados de concentração da substância química nos alimentos

A obtenção dos dados dos níveis de concentração de determinada substância química no produto é um ponto de extrema relevância para resultados confiáveis na avaliação da exposição. Portanto, a escolha dos procedimentos de amostragem, o método de análise, o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) ou o levantamento de relatórios com estas concentrações devem ser feitas de forma criteriosa (FAO/WHO, 2005).

O protocolo para atribuir valores de concentrações aos resultados não detectados ou não quantificados deve ser contemplado, uma vez que podem influenciar, de forma crítica, a estimativa de exposição dietética. Deve ser considerado o lado da precaução toxicológica, a menos que a presença do resíduo seja improvável, como por exemplo, quando o uso não é permitido ou o produto passa por processamento que remova o resíduo completamente. Desta forma deve-se assumir que existe a possibilidade da presença do resíduo, porém em concentrações que não são detectáveis ou quantificáveis. Geralmente, para atribuir valores a estes resultados é utilizado LOD/2 ou LOQ/2 para amostras com valores abaixo de LOD ou LOQ respectivamente (FAO/WHO, 2009b, 2012)

Uma das abordagens para a obtenção de dados de concentração de substâncias químicas é a de monitoramento e vigilância, que se mostra ideal para avaliação da exposição dietética crônica pós-regulação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários devido à sua proximidade com a realidade do consumo. Essa forma de amostragem representa a exposição de forma mais realista, pois abrange também os produtos com resíduos que podem ter sofrido degradação pelo transporte e armazenamento. A coleta das amostras é feita de maneira aleatória, perto do ponto de consumo, como supermercados e mercearias (FAO/WHO, 2005).

1.5.2 Dados de consumo

Os dados de consumo utilizados para análise da exposição devem considerar padrões de consumo em diferentes regiões e populações, por exemplo, padrões de consumo para subpopulações sensíveis como crianças, lactentes, idosos e grávidas. Essas informações podem influenciar nos resultados da avaliação da exposição (FAO/WHO, 2005).

Os métodos utilizados para o levantamento dos dados de consumo podem basear-se na população, através de dados de fornecimento de alimentos em nível nacional, consumo em domicílio, que são informações sobre o consumo total do agregado familiar, ou individual, a qual fornece informações detalhadas sobre padrão de consumo (FAO/WHO, 2009b).

Os métodos utilizados para levantar dados de consumos individuais são: pesquisa de registro alimentar, recordatório alimentar de 24 horas, questionário de frequência alimentar, pesquisa de histórico de dieta e questionário de hábitos alimentares. Nesta etapa, o levantamento de informações sobre o peso corporal dos indivíduos é importante para serem usadas no cálculo da exposição alimentar (FAO/WHO, 2005).

É importante lembrar que podem ser utilizados dados nacionais de consumo, porém recomenda-se a utilização de valores de referência nutricionais e toxicológicas internacionais (FAO/WHO, 2009b).

1.5.3 Peso corporal

Para a análise de ingestão é usado para cada peso individual o consumo individual relacionado para os casos em que são feitos levantamentos de dados individuais. Caso não haja esses dados individuais, devem ser usados pesos médios pré-estabelecidos (FAO/WHO, 2005).

1.6 Métodos para avaliação da exposição

Para a compreensão dos métodos de avaliação da exposição é necessário apresentar algumas definições:

- Ingestão Diária Admissível (IDA): Ingestão diária máxima admissível para exposição crônica a resíduos. É normalmente atribuída identificando a dose mais alta que não produz efeito adverso (NOAEL) a partir de estudos toxicológicos e dividindo este NOAEL por um fator de segurança (SHAH et al, 2017).

- Limite Máximo de Resíduos (LMR): Concentração máxima de resíduos (mg/kg ou µg/kg de peso) legalmente permitido em um alimento. Para o estabelecimento do LMR é feito um cálculo de exposição dietética considerando

uma dieta modelo e o LMR que se deseja atribuir. O resultado do cálculo não pode ultrapassar o valor de IDA (FAO/WHO, 2016a).

- Limite Máximo Tolerável (LMT): Concentração máxima de um determinado contaminante permitida no alimento ou em alimentos para animais. Define-se contaminante qualquer substância não adicionada intencionalmente a alimentos cuja presença é devido à produção, processamento, embalagem, transporte, ou como resultado de contaminação ambiental. Os metabolitos tóxicos de certos microfungos (micotoxinas) que não são adicionados intencionalmente também são definidos como contaminantes (FAO/WHO, 2018a).

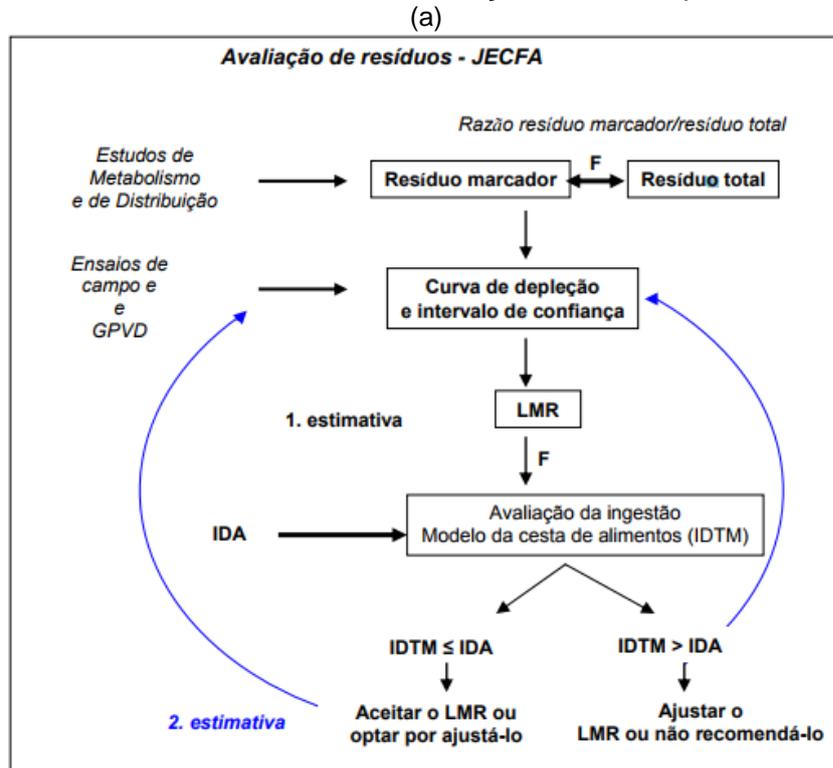
- Ingestão Diária Estimada (IDE): É a ingestão diária estimada quando se usa a concentração mediana da depleção dos resíduos para o cálculo da estimativa de exposição. Utilizada para estimar exposição a longo prazo (FAO/WHO, 2012).

- Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT): É uma estimativa de exposição dietética a resíduos de medicamentos veterinários com base em uma dieta modelo específica e considerando o LMR com uma correção para a proporção da concentração do resíduo marcador para o resíduo total. Ou seja, o cálculo se dá pelo somatório da multiplicação dos valores da ingestão diária de cada alimento da cesta pelos respectivos LMRs. Caso o IDMT exceda a IDA, o LMR é ajustado para garantir que o IDMT permaneça igual ou abaixo da IDA (FAO/WHO, 2012; SPISSO, 2010).

Normalmente, os valores de orientação, como a IDA, são estabelecidos nas duas primeiras etapas da avaliação do risco (identificação do perigo e caracterização do perigo). Caso esses valores não estejam disponíveis, o resultado da estimativa de exposição deve ser comparado à atividade da substância. Todos esses dados são considerados na etapa de caracterização de risco para se estabelecer os LMRs. O cálculo utilizado pelo JECFA para se estabelecer o LMR até 2005 era feito a partir de IDMT, porém o uso de uma cesta teórica não refletia a situação real e em 2006 foi proposto e adotado um novo cálculo baseado na comparação da IDA com IDE. A diferença entre os dois modelos é que se passou a utilizar ao invés da IDMT, a IDE derivada da concentração mediana da depleção do resíduo marcador, em substituição ao valor de LMR para o cálculo da estimativa provável de concentração do resíduo (**Figura 2**). O LMR descreve o limite de confiança superior unicaudal a 95% sobre o 95^o percentil, enquanto que a concentração mediana do resíduo

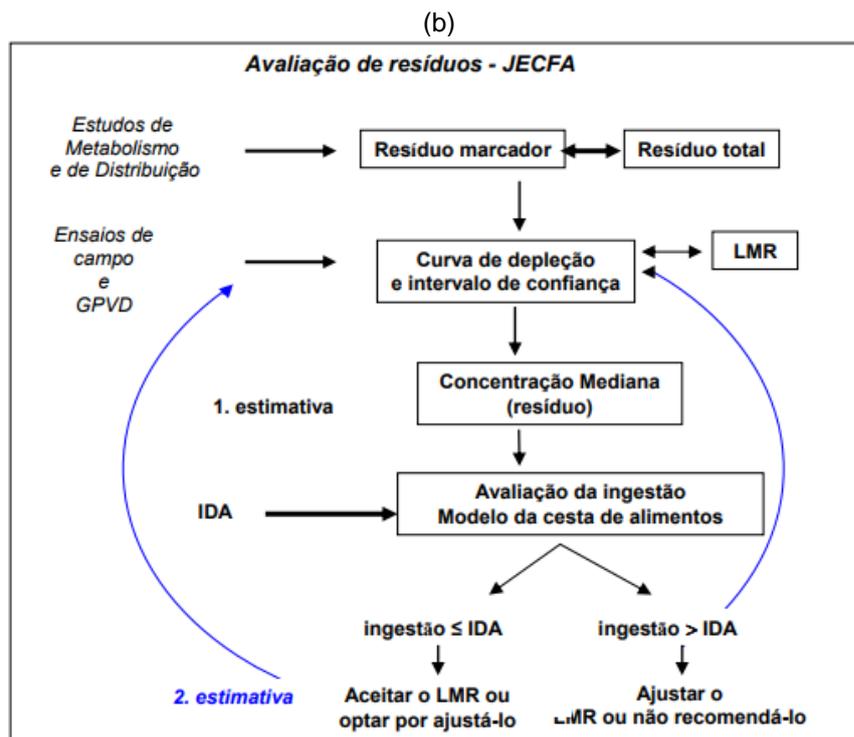
corresponde ao ponto na linha de regressão situado no mesmo *time point* de uma curva de depleção do resíduo marcador (**Figura 3**) (SPISSO, 2010).

Figura 2 - Comparação entre o modelo utilizando a IDMT (a) e a IDE (b) para avaliação dos dados de resíduos e recomendação de LMRs pelo JECFA.



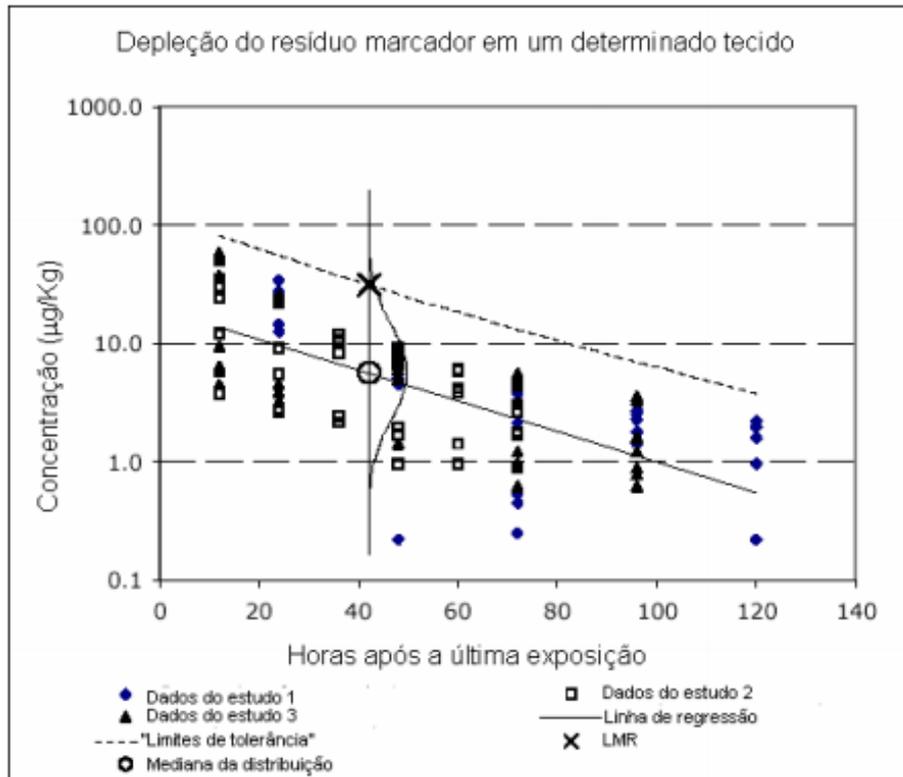
F: Razão do resíduo marcador em relação ao resíduo total.

Fonte: (FAO/WHO, 2006a apud SPISSO, 2010).



Fonte: (FAO/WHO, 2006b apud SPISSO, 2010).

Figura 3 - Relação entre o LMR e a concentração mediana.



Fonte: (FAO/WHO, 2006b apud SPISSO, 2010).

Normalmente as avaliações de exposição empregam uma abordagem gradual, iniciando com métodos de rastreio que requerem menos recursos e que caso sejam encontrados indícios que possam comprometer a segurança segue-se para avaliações adicionais com uso de métodos mais refinados (FAO/WHO, 2009b).

A estimativa determinística é um método de triagem que descreve algum parâmetro de exposição do consumidor, por exemplo, a exposição média de uma população. Caracteriza-se por utilizar um valor único para cada parâmetro, ou seja, para os dados de concentração podem ser usados a média, mediana ou mesmo um percentil elevado, e tem como objetivo apenas identificar produtos químicos que necessitam de avaliação de exposição mais abrangente (FAO/WHO, 2009b).

As avaliações de triagem feitas pelo JECFA para aditivos alimentares e produtos de uso veterinário são específicas e devem superestimar a exposição dietética para evitar resultados errôneos que não demonstrem preocupação de segurança. Um exemplo de método para avaliação de triagem é o uso de dietas modelo. Este método é utilizado pelo JECFA para estabelecer LMR para resíduos de produtos de uso veterinários em alimentos de origem animal. Essas dietas são construídas a partir de informações sobre o consumo de alimentos e devem

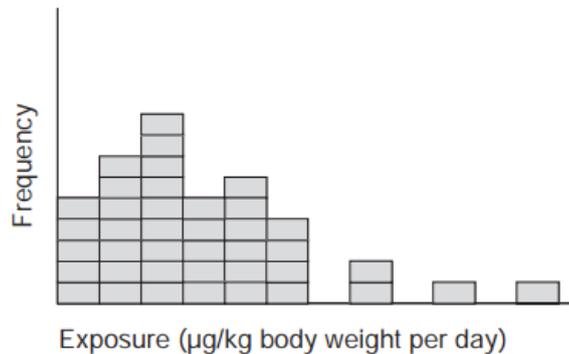
representar uma dieta típica para a população que será considerada. A criação de novos métodos de triagem que sejam mais apropriados pode ser uma opção para estimar a avaliação de pior caso para substâncias que sejam tóxicas tanto para exposição aguda e crônica como subpopulações específicas de interesse (FAO/WHO, 2005).

O segundo passo, em uma abordagem em camadas, seria a estimativa determinística pontual mais refinada. Na estimativa pontual, assim como no modelo determinístico, os dados de consumo alimentar geralmente consistem na média ou no percentil alto de todos os valores de consumo de um alimento, porém considerando uma determinada população de interesse e um determinado alimento. O modelo pode ser mais ou menos conservador de acordo com o interesse e a disponibilidade de informações. Nesta abordagem, características como o elevado consumo e o consumo de forma regular de um determinado alimento devem ser consideradas (FAO/WHO, 2009b).

Concluindo-se nos passos iniciais que existe uma preocupação relacionada à segurança, segue-se para uma avaliação mais refinada. A abordagem probabilística considera incertezas e variabilidades, fornecendo uma estimativa mais completa e precisa de exposição para avaliadores e gerentes de risco. A exposição deve ser avaliada com um conjunto de valores e não com um valor único. Nesta abordagem, informações sobre o alimento, quantidades consumidas, concentrações da substância química, considerações do processamento e preparo dos alimentos, etc, são incluídas nas avaliações, além de informações dos indivíduos como idade, sexo, etnia, nacionalidade, região e preferências pessoais (FAO/WHO, 2009b).

Frequentemente a variabilidade é descrita por um gráfico de frequência (**Figura 4**) onde o eixo horizontal corresponde ao nível de exposição e o eixo vertical a porção relativa da população.

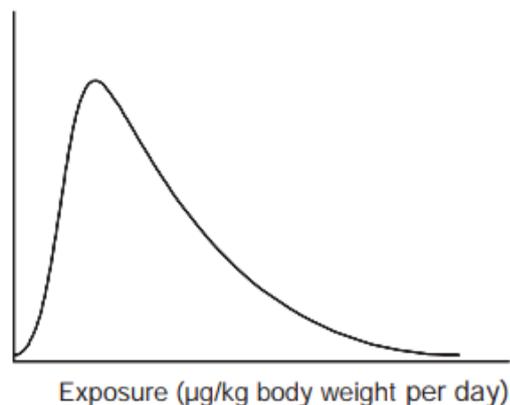
Figura 4 - Distribuição de frequência



Fonte: (FAO/WHO, 2009b).

A distribuição de frequência pode assemelhar-se com uma distribuição de probabilidade contínua (**Figura 5**)

Figura 5 - Distribuição de probabilidade contínua



Fonte: (FAO/WHO, 2009b).

A diferença fundamental do modelo probabilístico é que ao menos uma variável é representada por uma função de distribuição, no modelo determinístico é representada por um único valor, e a amostra modelo de cada distribuição é uma distribuição de exposições dietéticas potenciais resultantes de várias interações. Modelos simples podem ser usados para explicar a exposição à uma substância química a partir de um único alimento (FAO/WHO, 2009b).

Terminada a avaliação de exposição, a apresentação dos resultados deverá evidenciar o método que foi aplicado, o modelo utilizado, as premissas utilizadas, as limitações e as incertezas (FAO/WHO, 2005).

A ANVISA adota a metodologia determinística recomendada pela OMS e adotada pelo *Codex Alimentarius* para estimar a ingestão de resíduos no Brasil (BRASIL, 2017a).

1.7 Abordagens atuais de metodologias para avaliação de exposição dietética para resíduos de produto de uso veterinário

Na 70ª reunião do JECFA em 2011, solicitada pela CCRVDF, foi identificada a necessidade de revisar os princípios e metodologias para avaliar a exposição dietética para resíduos de produtos de uso veterinário em alimentos e seu relatório final propôs uma nova abordagem para essa avaliação, abrangendo:

- revisão da dieta modelo (cesta de mercado) utilizada pelo JECFA;
- possibilidade de simplificação da atual dieta modelo;
- possibilidade do desenvolvimento de várias dietas modelo para refletir diferenças regionais em padrões de consumo;
- desenvolvimento de diferentes abordagens para exposição dietética aguda e subcrônica (FAO/WHO, 2014).

A dieta modelo a qual o relatório se referiu era utilizada pelo JECFA para estabelecer LMRs para resíduos de produto de uso veterinários para cobrir altos consumidores de produtos de origem animal e estabelece de forma limitada o consumo diário de uma pessoa de 60 kg (FAO/WHO, 2009b). Esta dieta modelo possui a seguinte composição de acordo com a **Tabela1**:

Tabela 1 - Dieta modelo

Categoria de alimentos de origem animal	Tecido ou Produto	Consumo g/dia
Carne (500 g total)	Músculo	300
	Fígado	100
	Rim	50
	Gordura	50
Peixe	Músculo	300
	Leite integral	1500
Leite		
Ovo	Todo conteúdo (Exceto casca)	100
	—	20
Mel		

Fonte: (FAO/WHO, 2009b).

Podemos caracterizar uma estimativa de exposição baseada em uma dieta modelo como conservadora, pois é considerado o consumo máximo dos alimentos, que todos os alimentos são provenientes de animais tratados com produtos de uso veterinário e que, portanto, como consequência, todos apresentam resíduos em uma determinada concentração (FAO/WHO, 2012).

A falta de dados precisos resultantes de pesquisas de consumo levou à origem das dietas modelo. Para apoiar o estabelecimento de padrões de segurança alimentar, o Sistema de Monitoramento Global do Meio Ambiente da OMS – Programa de Monitoramento e Avaliação de Contaminação em Alimentos, também conhecido como GEMS/Food, concede estimativas brutas do tipo e da quantidade de alimentos disponíveis para consumo dentro de um país, resultantes de dados de fornecimento de alimentos e balanços alimentares, fornecendo uma base para a elaboração de uma dieta modelo mais “realista” para os cálculos de exposição a longo prazo (MACLACHLAN; MUELLER, 2012). As 17 dietas *cluster* do GEMS/Food, atualizadas em 2012, consistem em padrões alimentares agrupados por semelhanças e são utilizadas por comitês internacionais para avaliação de exposição aos resíduos presentes nos alimentos. O Brasil e mais 17 países, como Argentina, Chile, Colômbia, Equador, Honduras, Índia, Guatemala entre outros, pertencem ao grupo 5 (G05) das dietas *cluster* com o milho, arroz, trigo e o sorgo como os principais produtos alimentares (WHO, 2017b).

1.7.1 Avaliação da exposição aguda e crônica

A mesma equação geral (**equação 1**) pode ser utilizada para estimativas de exposição aguda e crônica e pode ser aplicada a qualquer alimento que contenha resíduo (FAO/WHO, 2014).

A abordagem atual para avaliação da exposição aguda referente a uma refeição ou um consumo por um período de 24 horas considera uma exposição de alto nível de cada alimento específico isoladamente. O resultado deve ser comparado a valores de ARfD para avaliar possível risco (FAO/WHO, 2014). Essa exposição é calculada pela equação de exposição dietética aguda estimada global (GEADE) (**Equação 2**):

$$\text{GEADE} = \frac{97,5 \text{ percentil do consumo do alimento (1 pessoa/dia)} \times \text{alta concentração do resíduo no tecido}}{\text{Peso corporal (kg)}}$$

(2)

A equação considera um nível alto de exposição para cada alimento de origem animal, individualmente. Para isso é selecionada uma alta concentração do

resíduo a que o consumidor pode ser exposto, combinada com um alto valor de consumo (FAO/WHO, 2014).

O modelo crônico considera que uma pessoa tenha um grande consumo de um determinado alimento ou grupo de alimentos de forma contínua por um longo período de tempo. As avaliações feitas a partir de um consumo a longo prazo devem ser comparadas com valores de orientação para toxicidade crônica como IDA para avaliação de risco (FAO/WHO, 2014). No caso de um conjunto de alimentos os cálculos para estimar a exposição dietética crônica estimada global (GECDE) são efetuados primeiramente pela **equação 3**, seguida pela utilização do seu resultado na **equação 4**:

$$\begin{array}{l} \text{Nível alto de exposição de cada} \\ \text{produto de origem animal} \\ \text{(mg/kg peso/dia ou mg/dia)} \end{array} = \begin{array}{l} 97,5 \text{ percentil do consumo} \\ \text{(kg/kg peso/dia ou kg/dia)} \end{array} \times \begin{array}{l} \text{Mediana dos resíduos} \\ \text{(mg/kg)} \end{array} \quad (3)$$

$$\begin{array}{l} \text{GECDE} \\ \text{(mg/kg peso/dia ou mg/dia)} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Nível alto de exposição de cada} \\ \text{produto de origem animal} \\ \text{(mg/kg peso/dia ou mg/dia)} \end{array} + \begin{array}{l} \text{Média total de exposição de} \\ \text{todos os outros produtos} \\ \text{(mg/kg peso/dia ou mg/dia)} \end{array} \quad (4)$$

A avaliação de exposição crônica se fundamenta que, a longo prazo, os consumidores não são susceptíveis a ingerir quantidades elevadas de diferentes produtos de origem animal simultaneamente, mas sim a um alto nível de consumo de apenas uma categoria de alimentos e o restante dos alimentos permaneceria dentro do consumo médio da população (FAO/WHO, 2012).

Para o levantamento do consumo para exposição dietética crônica é preferível o uso de dados de pesquisas com duração de mais de um dia para representar padrões habituais. Calcula-se o consumo de alimentos médio diário de cada indivíduo. Para estimativas baseadas em alimentos como o leite, a duração da pesquisa de consumo não é relevante, uma vez que tendem a serem consumidos diariamente sem grandes variações de um dia para o outro (FAO/WHO, 2014). O modelo de exposição dietética atual definiu o consumo padrão de leite para lactentes de 750 g/dia para ser usado no cálculo de estimativa de exposição. Este valor foi definido considerando o pressuposto padrão da OMS para um consumo de 0,75 litros de fórmula infantil por um lactente de 3 meses e 5 kg (FAO/WHO, 2012).

A dieta modelo atual constitui de informações mais específicas, diferenciando produtos originários de mamíferos e produtos de aves de capoeira em termos de miúdos, músculo, gordura e pele. Além disso, há uma subdivisão para os produtos de mamíferos podendo ser carne bovina, ovinos, caprinos, equinos e coelho e subdivisões para a categoria peixes, mariscos e crustáceos. O peso corporal padrão estabelecido considera diferentes grupos da população como adultos - 60 kg, crianças de 2 a 6 anos – 15 kg e lactentes de 0 a 3 meses – 5 kg. Contudo, este modelo é uma dieta construída e não representa uma dieta para qualquer população específica (FAO/WHO, 2012).

O desenvolvimento de uma metodologia para estimar a exposição aguda (GEADE) e crônica (GECDE) aos resíduos de produtos de uso veterinário pelo JECFA teve como propósito aumentar a precisão da avaliação, uma vez que o cálculo de IDE através de um valor extremo de distribuição não é realista em um cenário de exposição crônica. Contudo o comitê decidiu usar essa abordagem em paralelo com o modelo de IDE para ganhar experiência e melhorar a metodologia (FAO/WHO, 2014; FAO/WHO, 2016b). O 85º relatório da avaliação de alguns resíduos de medicamentos veterinário em alimentos realizada pelo JECFA demonstrou que foi adotado apenas os modelos GEADE E GECDE para avaliar a exposição alimentar aguda e crônica (FAO/WHO, 2018b).

1.8 A resistência aos antimicrobianos (RAM) como um risco global

A RAM ameaça a saúde pública devido ao crescimento de infecções que já não respondem mais ao tratamento normalmente utilizado. Este fato se confirma por dados fornecidos por todo o mundo de que a RAM vem aumentando para vários microrganismos causadores de infecções em suas unidades de saúde e na comunidade. A resistência microbiana é facilitada tanto pelo uso adequado quanto inadequado de medicamentos antimicrobianos na saúde humana e animal, na produção de alimentos e no uso impróprio para controlar a disseminação de infecções. A OMS procura estimular a reflexão e a ação política para combater a RAM uma vez que a resistência aos antimicrobianos é um problema complexo com vários fatores contribuintes e para enfrentá-la é essencial a contribuição de muitas pessoas e grupos sociais (OMS, 2012).

A RAM é uma ameaça global que deve ser combatida com máxima urgência e em resposta a essa crise, em maio de 2015, foi adotado um Plano de Ação Global pela Assembleia Mundial de Saúde. O plano contém cinco objetivos que possuem o propósito de melhorar a conscientização e a compreensão sobre este problema, fortalecer a base de conhecimento e evidência através da vigilância e da pesquisa, reduzir a incidência de infecção, otimizar o uso dos medicamentos antimicrobianos na saúde humana e animal e desenvolver investimento sustentável de acordo com as necessidades dos países, além de aumentar investimentos em novos medicamentos, ferramentas para diagnósticos, vacinas e outras intervenções. Todos os Estados Membros da OMS precisam desenvolver planos de ação nacionais de combate a RAM alinhados com o plano de ação global e devem considerar as necessidades nacionais e regionais (WHO, 2015).

A importância de uma ação conjunta que envolva os campos da saúde humana, saúde animal, agrícolas e ambientais justifica a colaboração entre Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), FAO e OMS. O reconhecimento da característica “*One Health*” do combate a RAM faz com que cada setor desenvolva políticas que possam influenciar diretamente na luta contra esse problema. A OIE, alinhada ao Plano de Ação Global da OMS, publicou em 2016 “A estratégia OIE sobre a resistência aos antimicrobianos e o uso prudente de antimicrobianos” que descreve os objetivos e as táticas da OIE para apoiar os países membros no intuito de alcançar o uso racional de produtos antimicrobianos e para vigilância do uso destes medicamentos e da resistência antimicrobiana (OIE, 2016). Da mesma forma, a FAO publicou em 2016 “O Plano de Ação da FAO sobre a resistência aos antimicrobianos 2016-2020” para apoiar de forma específica os setores de alimentos e agricultura na implementação do plano global de combate a RAM (FAO, 2016).

Seguindo as recomendações da OMS para assegurar uma ação global, eficaz e sustentável para o enfrentamento da resistência aos antimicrobianos, o Ministério da Saúde do Brasil publicou a portaria nº 2.775, em 22 de dezembro de 2016, que instituiu o comitê encarregado de elaborar e conduzir o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (CIPAN) no qual a RAM deveria ser tratada de forma integrada pelas áreas da saúde humana e animal pelo fato deste problema ter origem a partir do uso indiscriminado por pacientes e também na agricultura e pecuária (BRASIL, 2016). Considerando as necessidades nacionais, o Ministério da Saúde elaborou então o Plano de Ação

Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única (PAN-BR) de modo a atender o Plano de Ação Global. O plano nacional apresenta 14 objetivos principais, 33 intervenções estratégicas e 75 atividades, com vigência de 2018 a 2022, definidos de acordo com os 5 objetivos estratégicos do plano global. Os setores envolvidos e responsáveis pelo PAN-BR são Ministério da Saúde, ANVISA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Ministério das Cidades, Ministério da Educação e Cultura, Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, Ministério do Meio Ambiente, Fundação Nacional de Saúde, e apoio do Conselho Nacional de Saúde e Agência Nacional das Águas (Brasil, 2018a).

Por se tratar de uma abordagem de saúde única, o MAPA publicou um Plano de Ação específico para orientar as condutas no âmbito da agropecuária (Brasil, 2018b). A ANVISA, por sua vez, apresentou um Plano próprio de Ação da Vigilância Sanitária em Resistência aos Antimicrobianos devido à diversidade de ações necessárias na esfera da vigilância sanitária. Este plano norteará as ações da vigilância sanitária no Brasil nos diversos setores de atuação da agência tais como alimentos, serviços de saúde, laboratórios, entre outros para o enfrentamento deste problema global (Brasil, 2018c).

Anteriormente ao compromisso assumido e reafirmado através dos planos de Ações Nacionais, o MAPA já possui o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) para monitorar a efetividade dos controles implementados pelos sistemas de produção e a respectiva qualidade e segurança dos produtos de origem animal e vegetal disponibilizados ao comércio e consumo. O PNCRC é um programa de inspeção e fiscalização das cadeias produtivas de alimentos baseadas em análise de risco com o objetivo de verificar a presença e os níveis de resíduos de substâncias que são potencialmente nocivas à saúde do consumidor, tais como resíduos de produtos de uso veterinário, dentre eles os resíduos de antimicrobianos, resíduos de agrotóxicos e afins e de outros contaminantes químicos (BRASIL, 1999). São elaborados anualmente planos de amostragem e testes para carnes, ovos, leite, pescado e mel (BRASIL, 2018d). A ANVISA coordenou um Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet), que foi desenvolvido visando operacionalizar sua competência legal de controlar e fiscalizar resíduos de produtos de uso veterinário em alimentos, uma vez que estes resíduos poderiam significar risco à saúde pública. A primeira matriz escolhida foi o

leite bovino devido ao seu alto consumo pela população brasileira e o último relatório de atividades feito pela ANVISA foi o de 2006/2007 referente ao monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo em amostras coletadas no período de julho de 2006 a julho de 2007. Os resultados das análises das amostras coletadas pelo programa em 2009 e 2010 foram disponibilizados pela ANVISA para publicação por Pacheco-Silva et al. (2014). Os antimicrobianos estão entre os resíduos de produtos de uso veterinário que foram pesquisados (BRASIL, 2009a; PACHECO-SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014).

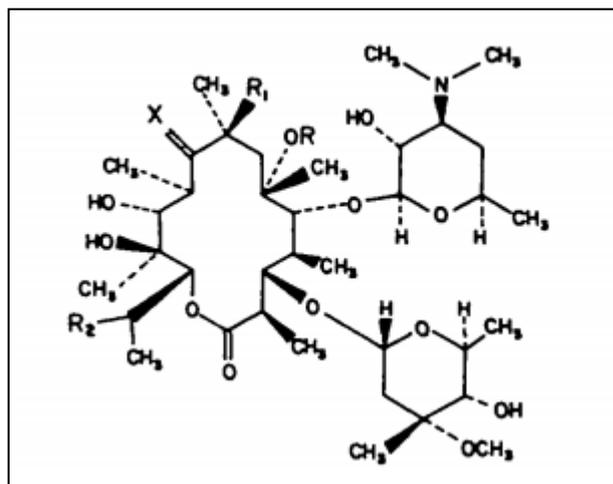
1.9 Antimicrobianos criticamente importantes para a saúde

A OMS identificou os antimicrobianos criticamente importantes para a saúde humana para ajudar a formular e priorizar a avaliação de risco e gestão estratégica de risco para conter a RAM. Os critérios empregados para essa classificação foram: a) antimicrobianos que são usados no tratamento de doenças humanas graves e que se apresentam como única ou uma das poucas opções de terapia e b) agentes antimicrobianos usados para tratar doenças causadas por microrganismos que podem ser transmitidos para humanos a partir de fontes não humanas ou doenças humanas causadas por microrganismos com genes de resistência adquiridos de fontes não humanas. Os antimicrobianos que atendem a esses dois critérios e que são classificados como antimicrobianos criticamente importantes de maior prioridade são as cefalosporinas de 3^a, 4^a e 5^a geração, macrolídeos, aminoglicosídeos, ansamicinas, carbapenêmicos, glicopeptídeos, glicilciclina, lipopeptídeos, macrolídeos e cetolídeos, monobactâmicos, oxazolidinonas, penicilinas, derivados do ácido fosfórico, polimixinas, quinolonas e medicamentos utilizados para tratar exclusivamente a tuberculose ou outras doenças micobacterianas (WHO, 2017a). Para complementar a identificação dos agentes antimicrobianos para humanos a OIE identificou os agentes antimicrobianos que são criticamente importantes na medicina veterinária. A sobreposição das listas críticas pode fornecer informações adicionais. Os agentes antimicrobianos para uso veterinário classificados como criticamente importantes foram aminoglicosídeos, cefalosporinas de 3^a e 4^a geração, macrolídeos, penicilinas, anfencóis, fluoroquinolonas, sulfonamidas, diaminopirimidinas e tetraciclina (OIE, 2018).

Clinicamente, os macrolídeos estão entre os quatro antimicrobianos mais utilizados para combater bactérias gram-positivas, algumas gram-negativas e micoplasma, além do uso como aditivos na prevenção de algumas doenças (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2011; SONG et al. 2016). São constituídos por uma estrutura química composta de um anel de lactona contendo entre 14 e 16 átomos com um ou mais açúcares ligados por ligação glicosídica (**Figura 6**) (GAYNOR; MANKIN, 2005). Os macrolídeos possuem ação antimicrobiana pela inibição da síntese proteica bacteriana através da sua ligação com a subunidade ribossômica 50S, mais precisamente pela interação com a 23S rRNA (KANO; RUBIN, 2010). A resistência bacteriana aos macrolídeos deve-se à modificação do sítio receptor por metilação ou mutação que impossibilita a ligação do antimicrobiano ao seu alvo ribossômico, ao efluxo do antimicrobiano ou por inativação enzimática do fármaco (LECLERCQ, 2002).

Além da preocupação quanto à resistência aos antimicrobianos, o uso de macrolídeos está associado a efeitos adversos como distúrbios gastrointestinais. Também foram relatados com o uso da eritromicina, reações de hipersensibilidade, com erupções cutâneas e febre, distúrbio transitório da audição, possíveis infecções oportunistas do trato gastrointestinal ou da vagina (HANG et al., 2008).

Figura 6 - Estrutura química dos macrolídeos



Fonte: (MAZZEI et al., 1993).

1.10 Resíduos de antimicrobianos macrolídeos em alimentos

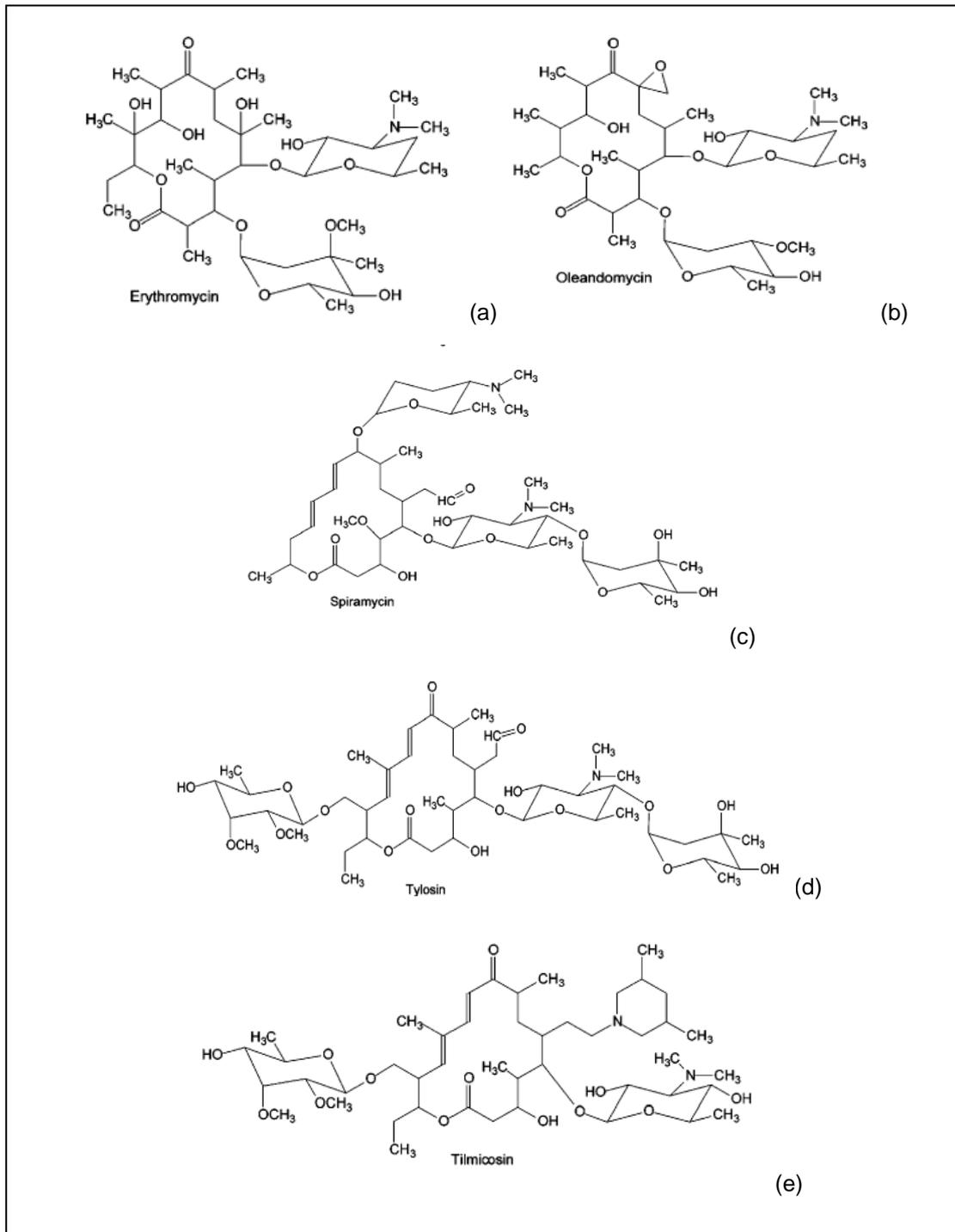
A saúde humana está diretamente ligada à qualidade dos alimentos e os resíduos de produtos de uso veterinário são um dos seus possíveis agentes de contaminação. Estes produtos são utilizados para melhorar a taxa de ganho de peso, melhorar a eficiência alimentar e prevenir ou tratar doenças em animais produtores de alimentos. Embora seu uso seja necessário, sempre existe o risco dos resíduos estarem presentes nos tecidos no momento do abate ou em produtos provenientes destes animais. A presença de resíduos em concentrações acima das consideradas aceitáveis pode ser devido, por exemplo, ao descumprimento das instruções técnicas ou do cálculo de dosagem fornecidas pelo fabricante, desrespeito ao período de carência determinado e por uso de equipamentos contaminados com a droga. Os antimicrobianos são os principais produtos de uso veterinário que potencialmente contaminam os alimentos de origem animal (BEYENE, 2016).

O leite é um alimento altamente consumido e por ser considerado uma importante fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas e sais minerais desempenha um papel significativo na nutrição humana (AFFOLTER et al, 2010). O uso de antibióticos na clínica veterinária para o tratamento de infecções, como da glândula mamária e do sistema reprodutivo, pode resultar na presença dos resíduos no leite (ANJOS et al, 2016). A presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos pode levar à exposição prolongada a estas substâncias por meio da ingestão em pequenas quantidades (BEYENE, 2016). Os macrolídeos, classificados como criticamente importantes para a saúde humana, são amplamente usados em animais produtores de alimentos, inclusive como aditivos zootécnicos e sabe-se que podem selecionar *Campylobacter* spp resistentes, sendo uma das poucas alternativas terapêuticas para infecções por essa bactéria, especialmente em crianças, para as quais não se recomendam as quinolonas (WHO, 2017a). As substâncias da classe dos macrolídeos com indicação para uso na espécie bovina são eritromicina, oleandomicina, gamitromicina, tulatromicina, espiramicina, tilmicosina, tilosina e tildipirosina (OIE, 2018). A **Figura 7** apresenta as fórmulas estruturais desses macrolídeos. Segundo informações do MAPA os princípios ativos da classe dos macrolídeos com produtos registrados no Brasil para uso em bovinos são a espiramicina, a gamitromicina, a tildipirosina, a tilmicosina e a tilosina (informação

verbal)¹, porém uma busca no Compêndio de Produtos Veterinários do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN) mostrou o registro de 4 produtos com princípio ativo espiramicina, 1 com tildipirosina, 2 produtos com tilmicosina e 7 com tilosina, mas nenhuma com gamitromicina (SINDAN, 2019). O plano de amostragem do PNCRC 2018 contemplou os macrolídeos eritromicina, espiramicina, tilosina e tilmicosina para avaliação em leite (BRASIL, 2018d).

¹ Informação fornecida por Bernardete F. Spisso, recebida em reunião de GT – revisão RDC 53/2012.

Figura 7 - Fórmulas estruturais da eritromicina (a), oleandomicina (b), espiramicina (c), tilosina (d) e tilmicosina (e)



Fonte: (WANG et al., 2006).

1.11 Fórmulas infantis produzidas a partir de leite bovino

Segundo a OMS, em associação com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), as crianças devem fazer aleitamento materno exclusivo até os 6

meses de idade e somente a partir deste momento receber alimentos complementares (UNICEF BRASIL, 2016; WHO, 2016). Somente em condições em que o aleitamento materno não é possível (casos de infecções maternas incompatíveis com a amamentação ou uso de algum fármaco que impossibilite o aleitamento materno), em casos em que se esgotem todas as possibilidades de relactação da mãe ou em situações em que o aleitamento materno deva ser interrompido temporariamente, as fórmulas infantis devem ser indicadas (BRASIL, 2015; BRASIL, 2009b). Porém, é importante salientar que os avanços tecnológicos da indústria de alimentos transformaram ao longo do tempo os modelos de alimentação infantil e apesar do aleitamento materno ser capaz de satisfazer por si só as necessidades nutricionais da maioria dos lactentes até o sexto mês de vida, sabe-se da existência do uso precoce ou inadequado das fórmulas lácteas por algumas crianças (ACCIOLY; SAUNDERS; LACERDA, 2002).

A fórmula infantil é um substituto do leite materno que deve possuir segurança nutricional e fórmula adequada para apoiar o crescimento e o desenvolvimento das crianças. É um produto à base de leite de vaca ou outros animais ou uma mistura destes e/ ou outros ingredientes adequados para a alimentação infantil (CODEX ALIMENTARIUS, 2007). Podemos classificá-las segundo suas características em:

- Fórmulas infantis para lactentes: Qualquer produto produzido com características adequadas para satisfazer, por si só, as necessidades nutricionais de lactentes saudáveis até seis meses de vida (0 a 5 meses e 29 dias). A formulação, única fonte de nutrientes para o lactente, deve levar em consideração os compostos e limites normalmente encontrados no leite humano e/ou benefícios similares aos encontrados em lactentes amamentados exclusivamente com leite humano (BRASIL, 2011a).

- Fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância: Produto, utilizado quando indicado, para lactentes saudáveis a partir do sexto mês de vida até doze meses de idade incompletos (11 meses e 29 dias) e para crianças de primeira infância saudáveis, constituindo-se o principal elemento líquido de uma dieta progressivamente diversificada (mista) (BRASIL, 2011b). Entende-se como criança de primeira infância, pessoa de 0 a 5 anos.

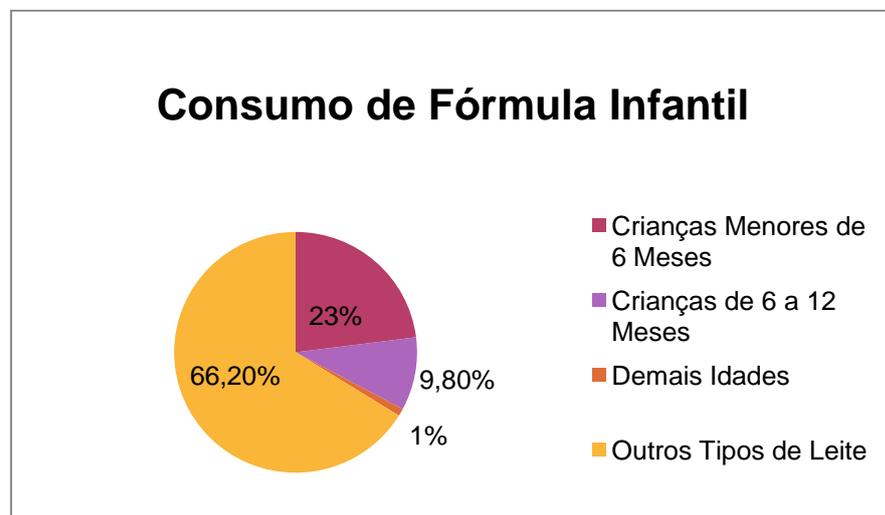
- Fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas:

Fórmulas infantis destinadas a atender, quando necessário, as necessidades nutricionais de lactentes e/ou crianças de primeira infância, decorrentes de alterações fisiológicas e/ou doenças temporárias ou permanentes e/ou para redução de risco de alergias em indivíduos predispostos (BRASIL, 2011c).

As principais modificações das fórmulas infantis produzidas a partir de leite de vaca são redução do teor de proteínas e eletrólitos, substituição de partes dos lipídeos por óleo vegetal, adição de outros carboidratos como maltodextrina e sacarose, além de adição de vitaminas e minerais. Algumas fórmulas infantis ainda apresentam adições específicas de alguns nutrientes para atender situações especiais (ACCIOLY; SAUNDERS; LACERDA, 2002).

Os resultados de um estudo que teve como objetivo avaliar o consumo, frequência e tipo de leite ingerido por crianças brasileiras a partir de dados secundários resultantes da Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde de 2006-2007 estão dispostos no **Gráfico 1**. Um alto consumo de fórmula infantil, possivelmente de forma prematura ou inadequada, foi observado (BORTOLINI et al., 2013).

Gráfico 1 - Consumo de fórmulas infantis por crianças brasileiras



Fonte: (Da autora, 2019).

Informações completas sobre os hábitos alimentares, incluindo a avaliação das práticas de aleitamento materno, alimentação complementar e do consumo alimentar, peso e altura das crianças até 5 anos serão geradas a partir do primeiro Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (Enani), iniciado em 2019 no Brasil por solicitação do Ministério da Saúde (ENANI, 2019).

Os rótulos das fórmulas infantis apresentam a indicação do volume e da frequência diária de consumo de acordo com cada faixa etária (**Tabela 2**), porém o mais adequado é o cálculo da dieta de forma individual de acordo com a **Quadro 1**, considerando um exemplo hipotético.

Tabela 2 - Exemplo de guia de referência para preparo de uma fórmula infantil para lactentes e de seguimento para lactentes (0 a 12 meses)

Idade do Lactente	Água previamente fervida (mL)	Número de Medidas Rasas	Número de Mamadeiras por Dia
1ª e 2ª Semanas	90	3	6
3ª e 4ª Semanas	120	4	5
2º Mês	150	5	5
3º Mês	180	6	5
4º e 5º Mês	210	7	4
A partir do 6º mês	210	7	3-4

Fonte: (Da autora, 2019).

Legenda: Tabela baseada nos rótulos de uma marca de produtos comercializados no Brasil.

Quadro 1 - Cálculo de dieta para lactentes utilizando fórmulas lácteas industrializadas

PROCEDIMENTOS	EXEMPLO: LACTENTE 45 DIAS, PESO: 4,1 KG
Calcular as necessidades energéticas	Necessidades Energéticas: $116 \times 4,1 = 476$ Kcal/dia
Escolher fórmula	Exemplo: NAN 1 - 67 Kcal/100ml- 1 medida/30ml água
Determinar a capacidade gástrica da criança: 25 a 30ml/kg/mamada. No caso de fórmula infantil modificada, deve-se escolher um volume múltiplo da reconstituição para cada medida.	Capacidade Gástrica: 102 a 123 ml O NAN é reconstituído com 1 medida para cada 30 ml. de água, então escolheremos o múltiplo de 30 mais próximo = 120 mL.
Calcular valor energético da mamadeira	100 ml = 67 Kcal 120 ml = x $\therefore x = 80,4$ Kcal
Dividir necessidade energética total pelo valor energético da mamadeira para obter número de mamadeiras/dia.	$\frac{476 \text{ Kcal/dia}}{80,4 \text{ Kcal/mamadeira}} = 5,9 = 6$ mamadeiras/dia
É possível que o lactente não fique satisfeito com 6 mamadeiras por dia. Neste caso, o volume da mamadeira poderá ser reduzido, aumentando-se o número total de mamadeiras por dia.	

Fonte: (ACCIOLY; SAUNDERS; LACERDA, 2002).

1.12 Regulamentações para resíduos e contaminantes em fórmulas infantis

A exposição desnecessária da população aos resíduos de produtos de uso veterinário pode causar sérios efeitos indesejados, por isso essas substâncias são regulamentadas e monitoradas com base em níveis máximos de resíduos aceitáveis

(LMR) ou em tolerâncias estabelecidas em cada país (ZHAO; ZULKOSKI; MASTOVSKA, 2017).

A quantidade provável de ingestão de um contaminante, a análise dos dados sobre sua ocorrência, a influência da adoção de boas práticas para reduzir seu teor e a avaliação de risco à saúde define sua quantidade tolerável (BRASIL, 2008b). A Portaria 977/1998 referente às fórmulas infantis definia que o alimento não podia conter resíduos de antibióticos determinados por meios de métodos de análises apropriados, porém esta portaria foi revogada e foram publicadas as Resoluções nº 43, 44 e 45/2011 (BRASIL, 1998; 2011a; 2011b; 2011c). Segundo essas resoluções, os produtos devem atender aos regulamentos técnicos específicos de contaminantes, no entanto a RDC nº 53 de 2012 que dispõe sobre o Regulamento Técnico Mercosul e estabelece limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, não inclui as fórmulas infantis no seu escopo (BRASIL, 2012a). Somente micotoxinas (aflatoxinas B1, B2, G1 e G2) e metais (arsênio inorgânico, cádmio total, chumbo total e estanho inorgânico) estão contemplados com valores limites específicos para fórmulas infantis em regulamentos nacionais (BRASIL, 2011d; BRASIL, 2017b). Assim, como no Brasil não há LMR ou tolerância para antimicrobianos em fórmulas infantis estabelecidos pela legislação, a presença destes contaminantes não é aceitável. Segundo o *Codex Alimentarius*, as fórmulas infantis devem respeitar os limites máximos da norma geral para contaminantes, norma essa que não determina um valor de resíduos de antimicrobianos para esses produtos (CODEX ALIMENTARIUS, 2007). Preocupados com a presença de antimicrobianos residuais nos alimentos e seu impacto negativo sobre a saúde humana, a União Europeia trabalha com o princípio da “tolerância zero” para produtos alimentares que não possuem LMRs estabelecidos (AGUILERA-LUIZ et al, 2012). Estados Unidos da America e Japão não possuem LMRs de antimicrobianos específicos para fórmulas infantis.

Uma revisão de literatura intitulada *“Infant formula: occurrence, sources and pathways of chemical contaminants and residues and their potential detrimental effects on infant health”* dos autores Bianca Figueiredo de Mendonça Pereira, Cristine Couto de Almeida, Katia Christina Leandro, Marion Pereira da Costa, Carlos Adam Conte Junior e Bernardete Ferraz Spisso foi submetida à revista *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* e aborda os principais resíduos e contaminantes pesquisados em fórmulas infantis.

1.13 Métodos analíticos e dados de ocorrência de resíduos de antimicrobianos em fórmulas infantis

A preocupação mundial com relação à resistência aos antimicrobianos está levando vários pesquisadores ao desenvolvimento de métodos de análise para determinação de resíduos dessas substâncias em alimentos. A produção de certas fórmulas infantis é feita a partir de leite bovino e um dos principais problemas para a determinação de antimicrobianos nessa matriz é o tratamento da amostra. A presença de materiais gordurosos, carboidratos e outras substâncias fazem deste produto uma matriz complexa onde a eficiência da extração precisa ser garantida para evitar o mascaramento do analito a ser pesquisado (ZHAN et al, 2013). Acerca das fórmulas infantis, métodos para análise de antimicrobianos já foram apresentados. Alguns compreendem a análise de múltiplas classes de produtos de uso veterinários e outros contaminantes (AGUILERA-LUIZ et al, 2012; ZHAN et al, 2013; ZHAO; ZULKOSKI; MASTOVSKA, 2017; DESMARCHELIER et al, 2018). Há também métodos validados para análise de classes específicas ou antimicrobianos específicos como quinolonas, sulfonamidas, β -lactâmicos e cloranfenicol (RODRIGUEZ; MORENO-BONDI; MARAZUELA, 2008; RODRIGUEZ et al, 2010; HERRERA-HERRERA et al, 2011; GAO et al, 2012; DÍAZ-BAO et al, 2015; AHN et al, 2017; BESSAIRE et al., 2018). Até o momento não foi identificado nenhum método específico para a determinação de resíduos de macrolídeos em fórmulas infantis, embora os macrolídeos sejam amplamente empregados na produção leiteira. Estudos que apresentaram em seus resultados a avaliação da ocorrência de antimicrobianos em amostras reais de fórmulas infantis estão demonstrados na **Tabela3**.

Tabela 3 - Panorama da ocorrência de antimicrobianos em fórmulas infantis

País	Classe do antimicrobiano	Nº de amostras analisadas	Técnica utilizada	Ocorrência (substância detectada)	Nº de amostras contaminadas	Concentração encontrada (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Referência
Espanha	Quinolonas	16	UPLC -MS/MS	Sem Ocorrência	--	--	0,13 – 1,73	HERRERA- HERRERA et al., 2011
Espanha e Colômbia	Fluoroquinolonas	100	LC-FLD E LC-MS/MS	Sem Ocorrência	--	--	6 – 80	RODRIGUEZ et al., 2008
Espanha	Multiresíduos	9	UHPLC – MS/MS	Tilmicosina Trimetoprim	1 1	17,1 < 5	6,7 0,3	AGUILERA-LUIZ et al., 2012
China	Multiresíduos	30	UPLC – MS/MS	Lincomicina Enoxacin	1 1	5,1 2,0	0,2 0,2	ZHAN et al., 2013

Fonte: (Da autora, 2019).

Como ainda não há LMRs ou tolerâncias específicas para fórmulas infantis nas legislações mundiais atuais, alguns pesquisadores utilizaram então os valores de LMR estabelecidos para o leite para o desenvolvimento de seus métodos (ZHAN et al, 2013; HERRERA-HERRERA et al, 2011; ZHAO; ZULKOSKI; MASTOVSKA, 2017; DÍAZ-BAO et al, 2015). Porém, é importante considerar que os lactentes pertencem a um grupo mais susceptível a contaminantes e resíduos, uma vez que a ingestão relativa de alimentos é três vezes maior do que a ingestão dos adultos (HERRERA-HERRERA et al, 2011).

Considerando a susceptibilidade do público consumidor das fórmulas infantis e o fato de que a legislação brasileira na área de alimentos é positiva, ou seja, o que não constar na legislação não pode estar presente no alimento, os antimicrobianos não podem ser detectados nas fórmulas infantis. Os métodos analíticos precisam então ser desenvolvidos a fim de atender a essa premissa.

1.14 Método QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) para resíduos de macrolídeos em leite e fórmulas infantis

O método de preparo de amostras original denominando QuEChERS foi proposto em 2003 por Michelangelo Anastassiades inicialmente para a determinação de pesticidas. Ao longo do tempo, a aplicabilidade do método de extração foi ampliada para os campos dos medicamentos veterinários, micotoxinas e outros (PRESTES et al, 2009).

O tamanho da amostra a ser utilizada no método QuEChERS deve ser a menor possível que seja representativa estatisticamente. A escolha do solvente de extração deve considerar a habilidade de extrair em diferentes polaridades, apresentar seletividade durante a extração, partição e *clean up*, compatibilidade com as técnicas cromatográficas, baixo custo, segurança e atender a legislação ambiental. A acetonitrila (ACN) é um dos solventes que podem ser utilizados por possuir característica de ser miscível com água e promover a extração em uma única fase em contato com a matriz. A adição de sais ao extrato quando é utilizada a ACN promove o efeito "*salting out*" e resulta na separação entre as fases orgânica e aquosa. O uso dos sais secantes tem como objetivo melhorar a recuperação. A etapa de *clean-up* confere robustez e confiabilidade aos resultados da cromatografia, uma vez que compostos não voláteis da matriz podem alterar a

resposta do sistema. Nesta etapa, a extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*) que emprega de 250 a 1000 mg de diferentes sorventes para retenção de interferentes da matriz (PRESTES et al, 2009).

Como não se identificou na literatura métodos para análise de macrolídeos em fórmulas infantis, a proposta da dissertação se baseou em avaliar a aplicabilidade de um método analítico desenvolvido por Costa et al. (2015) para análise de macrolídeos em leite a essa matriz. O tratamento da amostra constitui em uma nova abordagem QuEChERS, empregando um QuEChERS alcalino, com uma mistura de sais composta de Na_2SO_4 , NaCl e K_2CO_3 sem uma etapa adicional de *clean-up*, seguida por cromatografia líquida e espectrometria de massas sequencial. O método, desenvolvido inicialmente apenas para a tilosina, também foi capaz de extrair de forma eficiente espiramicina, troleandomicina, oleandomicina, roxitromicina, eritromicina e a claritromicina, com recuperações de 74 – 104% a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de tilosina, eritromicina, espiramicina e oleandomicina e 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para troleandomicina, roxitromicina e claritromicina (COSTA et al, 2015). Embora a tilmicosina não tenha sido citada no artigo de Costa e colaboradores (2015), todas as análises contempladas para as demais substâncias para avaliação dos parâmetros de validação foram feitas para a mesma. Uma consideração importante com relação a este trabalho foi a detecção de macrolídeos em 26 amostras das 41 adquiridas, sinalizando uma grande incidência destes antimicrobianos em leite (COSTA, 2014).

1.15 Validação de método analítico para a determinação de produtos de uso veterinário em alimentos

O desenvolvimento de um método analítico se torna necessário para dar suporte à tomada de decisão na avaliação de conformidade de um produto ou serviço quanto as suas especificações, atendimento à norma nacional ou internacional, legislação ou mesmo a de algum critério interno ou externo de qualidade (BRASIL, 2011e).

A validação é um estudo experimental e documentado realizado para verificar os possíveis erros que os métodos analíticos possam vir a apresentar, sejam eles aleatórios ou sistemáticos, e que tem como objetivo confirmar que o método

analítico desenvolvido responde à sua proposta com a confiabilidade dos resultados das medições assegurada (BRASIL, 2011e).

De acordo com o objetivo que se pretende alcançar com o método analítico desenvolvido, a validação precisa contemplar a avaliação das características de desempenho de acordo com a **Tabela 4**.

Tabela 4 - Características de desempenho necessárias para cada tipo de método analítico

		Capacidade de Detecção CC β	Limite de Decisão CC α	Veracidade / Recuperação	Precisão	Seletividade/ Especificidade	Aplicabilidade / Robustez / Estabilidade
Método Qualitativo	T	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Método Quantitativo	T	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

T= Métodos de Triagem; C = Métodos de Confirmação; + = Determinação Obrigatória

Fonte: (Modificado de UNIÃO EUROPEIA, 2002).

A orientação do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) sobre validação de métodos analíticos classifica o parâmetro da robustez como opcional dentro dos estudos de validação, uma vez que está mais associado a estudos de otimização (INMETRO, 2018).

Sendo a característica de desempenho aplicável, os parâmetros e os critérios de aceitação devem levar em consideração o nível da concentração de interesse. Para as substâncias permitidas, considera-se o LMR estabelecido, para as substâncias banidas ou proibidas deve ser utilizado o Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR). No Brasil, quando não há LMDR definido utiliza-se valores estipulados em normas publicadas pelo MAPA (BRASIL, 2011e). Quando se tratar de substância registrada para uso em espécies produtoras de carne (bovina, aves, suína e equina), leite, pescado, mel, ovos e avestruz e seu respectivo LMR não for estabelecido, o Limite de Referência para Tomada de Ação Regulatória gerencialmente adotado é de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou 10 ng/mL , dependendo da matriz (BRASIL, 2012b).

A validação de métodos analíticos específicos para determinação de produtos de uso veterinário em matrizes de origem animal deve ser conduzida de acordo com as seguintes características de desempenho e seus critérios de aceitação:

- Seletividade;
- Efeito Matriz;
- Linearidade;
- Recuperação / Veracidade;
- Precisão (Repetibilidade);
- Precisão (Reprodutibilidade intralaboratorial);
- Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$);
- Robustez (BRASIL, 2011e).

1.15.1 Seletividade

Capacidade do método analítico de diferenciar a substância de interesse de outras substâncias que também podem estar presentes. Essa característica é determinada essencialmente pela técnica de medição, mas pode também ser alterada pelo tipo de composto ou matriz analisada (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

1.15.2 Efeito matriz

O efeito matriz é um estudo de seletividade para verificar possíveis interferências dos componentes da matriz que pode gerar aumento ou diminuição do sinal instrumental ou resposta instrumental (BRASIL, 2011e).

1.15.3 Linearidade

Capacidade do método analítico de produzir resposta diretamente proporcional à concentração do analito na amostra, ou seja, uma curva de calibração é ajustada adequadamente pela equação de uma reta (função afim). A curva de calibração deve ser determinada de acordo que o LMR se encontre preferencialmente perto da região central e para as substâncias banidas, o LMDR ou valores alvo estipulados devem fazer parte da curva (BRASIL, 2011e).

1.15.4 Recuperação / Veracidade

A recuperação é calculada caso não haja um material de referência certificado, sendo a porcentagem da concentração real de uma substância adicionada que é recuperada durante o processo analítico (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

1.15.5 Precisão

É a estimativa da dispersão entre resultados de ensaios independentes, porém em determinadas condições específicas. Calcula-se através do desvio padrão do resultado do ensaio em que uma menor precisão é resultado de um elevado desvio padrão. Pode ser verificada através de três maneiras: 1. da repetibilidade, que é a estimativa da dispersão dos resultados de análises independentes com o mesmo método, mesmo material de ensaio, mesmo laboratório, mesmo operador e mesmo equipamento; 2. da reprodutibilidade intralaboratorial (precisão intermediária), que é a verificação da precisão obtida no mesmo laboratório em condições específicas, porém podendo variar o método, materiais de ensaio, operadores e ambientes, ao longo de intervalos de tempo justificadamente longos; 3. da reprodutibilidade, utilizando o mesmo método, mesmo material de ensaio, porém em laboratórios diferentes e com operadores e equipamentos diferentes (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

1.15.6 Limite de decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de detecção ($CC\beta$)

São parâmetros que medem o desempenho do procedimento analítico considerando a incerteza da medição no nível de concentração no qual as decisões são tomadas (BRASIL, 2011e).

O $CC\alpha$ é definido como o limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro α . O $CC\beta$ é o teor mais baixo da substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado em uma amostra com uma probabilidade de erro β . Para substâncias que possuem limite permitido, o $CC\beta$ é a concentração que o método é capaz de detectar concentrações neste limite com uma incerteza estatística de $1 - \beta$. Para substâncias que não

possuem limite permitido definido, o $CC\beta$ é a menor concentração em que o método é capaz de detectar amostras contaminadas com uma incerteza estatística de $1 - \beta$ (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

1.15.7 Robustez

Propensão do método de sofrer alterações na resposta em casos de variações das condições experimentais, as quais podem ser expressas como uma lista de materiais da amostra, das substâncias a analisar, das condições de estocagem, das condições ambientais e/ou de preparação da amostra em que o método pode ser aplicado da forma como foi desenvolvido ou com pequenas alterações específicas. Todas as condições experimentais sujeitas a variações como pH, temperatura, composição da amostra e estabilidade dos reagentes devem ser indicadas caso a alteração possa afetar os resultados analíticos (UNIÃO EUROPEIA, 2002). O INMETRO classifica este parâmetro como opcional (INMETRO, 2018).

1.15.8 Ampliação do escopo do procedimento analítico validado

Para a inclusão de nova matriz ou novo analito em método analítico validado, o mesmo precisa ser reavaliado de forma a demonstrar que a inclusão do novo analito ou da nova matriz não altera o desempenho geral do método. Para isso, os parâmetros de Linearidade, Seletividade / Efeito Matriz, Veracidade / Recuperação e Precisão devem ser avaliados (BRASIL, 2011e).

1.15.9 Abordagens alternativas de validação

Segundo a Decisão 657/2002 da Comissão Europeia, os modelos alternativos de validação podem ser utilizados, porém devem ser estabelecidos no protocolo de validação o modelo e as estratégias, juntamente com os pré-requisitos, pressupostos e fórmulas ou fornecer referência quanto a sua disponibilidade (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

O ResVal é uma ferramenta de software para cálculo de resultados de validação com uma abordagem simplificada e padronizada que atende aos

requisitos da 657/2002 da Comissão Europeia e se enquadra como modelo alternativo de validação. Zuchowska et al. (2016a; 2016b), Wozniak et al. (2014a; 2014b; 2017) e Witek et al. (2018) avaliaram os dados gerados pela validação através da utilização do software ResVal.

1.16 Justificativa

O Plano de Ação Global de enfrentamento à resistência aos antimicrobianos (RAM) foi estabelecido com o propósito de assegurar o maior tempo possível a efetividade dos tratamentos existentes para as doenças resultantes de infecções. Dentre os cinco objetivos do plano instituídos para combater a RAM, o objetivo 2 possui a finalidade de promover ações para fortalecer a base de conhecimentos e evidências através da vigilância e da pesquisa. O apoio dos governos nacionais, organizações intergovernamentais, agências, organizações profissionais, organizações não governamentais, indústria e comunidade acadêmica são essenciais para geração deste conhecimento e nas práticas a serem adotadas. Algumas informações ainda são desconhecidas e precisam ser esclarecidas, uma delas é a compreensão de como é o surgimento da resistência e como ela se dissemina. Por isso a compreensão de como a resistência circula entre humanos e animais e através dos alimentos, água e meio ambiente gera consideráveis informações para o desenvolvimento de ferramentas, políticas e regulamentos de combate a esse grave problema. Dentro do contexto deste trabalho, é importante considerar também o objetivo 4, que tem como tema a otimização do uso de medicamentos antimicrobianos em saúde humana e animal. Sabe-se que a resistência aos antimicrobianos está ligada ao uso excessivo destes agentes, que aliás, podem ser adquiridos comumente com alta facilidade e as regulamentações para a utilização em muitas áreas não são eficazes ou são simplesmente mal aplicadas (WHO, 2015).

A formula infantil em pó pode ser a única fonte de alimento para muitos lactentes durante os 6 primeiros meses de vida e uma vez que as crianças são mais vulneráveis e proporcionalmente mais expostas a contaminantes de alimentos do que os adultos, considerando a taxa de consumo elevado por peso corporal, é de extrema importância que esses produtos sejam livres de contaminantes (RODRIGUEZ et al, 2008).

A possível presença de resíduos de antimicrobianos, entre eles os macrolídeos, antimicrobianos considerados pela OMS como criticamente importantes de máxima prioridade para a saúde humana, pode comprometer a inocuidade das fórmulas infantis e a segurança dos lactentes. Assim, o conhecimento sobre a exposição de lactentes aos resíduos de macrolídeos nas fórmulas infantis é fundamental para nortear ações de vigilância sanitária a fim de minimizar o risco relativo à resistência bacteriana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a exposição dietética de lactentes aos resíduos dos antimicrobianos macrolídeos eritromicina, espiramicina, oleandomicina, tilmicosina e tilosina pela ingestão de fórmulas infantis para lactentes (0 a 6 meses) e de fórmulas infantis de seguimento para lactentes (a partir do 6º mês) produzidas a partir de leite bovino.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar e validar o método analítico para determinação de resíduos de cinco macrolídeos (eritromicina, espiramicina, oleandomicina, tilosina e tilmicosina) por LC-MS/MS e método de preparo de amostra QuEChERS alcalino para a matriz fórmula infantil.
- Investigar a ocorrência de resíduos de eritromicina, espiramicina, oleandomicina, tilmicosina e tilosina em fórmulas infantis para lactentes (0 a 6 meses) e de seguimento para lactentes (a partir do 6º mês) utilizando o método analítico validado.
- Estimar a exposição dietética de lactentes (0 a 12 meses) aos 5 antimicrobianos pesquisados.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais

3.1.1 Padrões

Os padrões utilizados neste estudo estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Lista de padrões utilizados

ANALITO	ACRÔNIMO	FABRICANTE	LOTE	NÚMERO DO CAS
Espiramicina	ESP	Sigma-Aldrich	SZBC002XV	8025-81-8
Eritromicina hidratada	ERI	Sigma-Aldrich	MKBR6032V	114-07-8
Fosfato dihidratado de oleandomicina	OLE	Dr. Ehrenstorfer	80609	7060-74-4
Tilmicosina	TILM	Dr. Ehrenstorfer	90810	108050-54-0
Tartarato de tilosina	TIL	U.S.Pharmacopeia	F0D333	1405-54-5
Roxitromicina (*)	ROX	Dr. Ehrenstorfer	90630	80214-83-1

(*) A Roxitromicina foi utilizada como padrão interno.

Fonte: (Da autora, 2019).

3.1.2 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados neste estudo foram:

- Acetonitrila para Cromatografia Líquida, teor de pureza $\geq 99,9\%$, Merck (Alemanha);
- Acetonitrila para Cromatografia Líquida - Espectrometria de Massas, teor da pureza $\geq 99,9\%$, Merck (Alemanha);
- Água purificada tipo I (Milli-Q);
- Ácido fórmico, teor da pureza 98-100%, Merck (Alemanha);
- Carbonato de potássio PA (K_2CO_3), teor da pureza $\geq 99\%$, Merck (Alemanha);
- Cloreto de sódio (NaCl), teor da pureza 99,5 – 100,5%, Merck (Alemanha);

- g) Metanol para Cromatografia Líquida, teor da pureza $\geq 99,8\%$, Merck (Alemanha);
- h) Metanol para Cromatografia Líquida - Espectrometria de Massas, teor da pureza $\geq 99,9\%$, Merck (Alemanha);
- i) Sulfato de sódio anidro granulado (Na_2SO_4), teor da pureza $\geq 99\%$, Merck (Alemanha).

3.1.3 Equipamentos e acessórios

Os equipamentos utilizados para a etapa de extração, preparo de soluções e armazenamento estão listados a seguir:

- a) Agitador de tubos tipo vórtex Multi Reax (Heidolph, Alemanha);
- b) Agitador de tubos tipo vórtex MA-162 (Marconi, Brasil);
- c) Balança analítica LP 620P (Sartorius, Alemanha);
- d) Balança semi-micro analítica com resolução de 0,00001g (Metler Toledo, Suíça);
- e) Capela de exaustão;
- f) Centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf, EUA);
- g) Freezer frost free eletrônico 280 (Brastemp, Brasil);
- h) Freezer de ultra-baixa temperatura FORMA 88000 series (Thermo Scientific, EUA);
- i) Refrigerador frost free 380 (Brastemp, Brasil);
- j) Refrigerador frost free DF34 (Electrolux, Suécia);
- k) Módulo de aquecimento com unidade de evaporação com vapor de nitrogênio React-Therm III (Pierce, EUA);
- l) Sistema de obtenção de água tipo I, Milli-Q (Millipore, EUA);
- m) Termômetro digital modelo 7424.02.00, -50°C a 70°C (Incoterm, Brasil).

Para a separação e detecção das substâncias foram utilizados os seguintes equipamentos e acessórios:

- a) Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu Prominence, composto de uma bomba quaternária LC-20AD, um degaseificador de membrana DGU-20A5, um autoamostrador SIL-20AC, um forno de coluna CTO-20AC e uma bomba controladora CBM-20A;
- b) Espectrômetro de massas triplo quadrupolo API 5000 Applied Biosystems / MDS Sciex, com fonte TurbolonSpray[®];
- c) Software para utilização do sistema Analyst[®] versão 1.4.2 da Applied Biosystems;

- d) Coluna analítica Varian Polaris® C18 (100 mm x 2 mm x 3 µm de tamanho de partícula;
- e) coluna de guarda do mesmo material da coluna analítica.

3.2 Preparo de soluções estoque

As soluções-estoque para cada analito foram preparadas em metanol, na concentração nominal de 1000 µg/mL e armazenadas à temperatura $\leq -70^{\circ}\text{C}$. As massas teóricas utilizadas para o preparo das soluções foram calculadas considerando as correções de pureza, teor de água e base livre. Para a produção das soluções de trabalho foram feitas diluições a partir das soluções-estoque de acordo com as necessidades ao longo dos estudos.

3.3 Aquisição e preparo das amostras

Foram utilizadas fórmulas infantis para lactentes (tipo1) e de seguimento para lactentes (tipo 2), produzidas a partir de leite bovino. A abordagem para a obtenção dos dados de concentração do resíduo foi sob a ótica de vigilância e monitoramento, ideal para avaliação dietética crônica pós-regulação. Devido à proximidade com a realidade do consumo, a compra foi feita de forma aleatória, de diferentes marcas e lotes, em supermercados e drogarias na cidade do Rio de Janeiro - RJ. No laboratório, os produtos foram cadastrados, codificados e mantidos nas suas embalagens originais em temperatura ambiente controlada ($\leq +27^{\circ}\text{C}$) (**Tabela 6**). O preparo das amostras atendeu às recomendações presentes nos rótulos de cada produto e a reconstituição foi feita com água purificada tipo I (Milli-Q). Uma amostra de leite integral em pó (código do laboratório: 002/2018) adquirida em supermercado na cidade do Rio de Janeiro foi empregada para o estudo de avaliação da aplicabilidade do método analítico desenvolvido para leite em fórmulas infantis.

Tabela 6 - Lista de fórmulas infantis

Fórmula Infantil	Fabricante / Marca	Lote	Código do laboratório
Tipo 1	1 / A	A	004/2018
		B	010/2018
		C	011/2018
	2 / A	A	012/2018
		B	013/2018
		C	014/2018
		D	042/2019
	3 / A	A	015/2018
		B	016/2018
		C	017/2018
	3 / B	A	018/2018
		B	019/2018
		C	020/2018
	1 / B	A	021/2018
		B	022/2018
C		023/2018	
Tipo 2	1 / A	A	024/2018
		B	025/2018
		C	026/2018
	2 / A	A	005/2018
		B	027/2018
		C	028/2018
		D	029/2018
	3 / A	A	030/2018
		B	031/2018
		C	037/2018
	3 / B	A	032/2018
		B	033/2018
		C	038/2018
	1 / B	A	034/2018
		B	035/2018
C		036/2018	

Fonte: (Da autora, 2019).

3.4 Condições cromatográficas e espectrométricas do método desenvolvido e validado para análise de macrolídeos em leite (LC-MS/MS)

As separações cromatográficas foram realizadas a 40°C e a fase móvel consistiu em água purificada tipo I com 0,1% de ácido fórmico (fase A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (fase B), fluxo total da fase móvel de 0,3 mL/min, sendo o volume de injeção de 10 µL. O gradiente se iniciou com 75% de fase A durante 1 min, passando para 50% em 9,5 min e 5% de fase A em 9,6 min mantendo essa composição por 0,4 min. Aos 10,1 min, o eluente A retorna para 75% para reestabelecer a condição inicial até completar 20 min, tempo total de corrida. Os parâmetros para a espectrometria de massas com ionização por eletrospray no modo positivo foram: potencial de ionspray de 5 kV, temperatura de fonte de 550°C, potencial de entrada de 10 V, nitrogênio como gás de secagem e nebulizador igual a 55 psi, gás de colisão (*CAD gas*) com N₂ valor de 6 e gás de cortina igual a 10 psi. Os parâmetros do LC - MS/MS para os analitos alvo estão resumidas na **Tabela 7**(Costa et al., 2015).

Tabela 7 - Parâmetros do LC - MS/MS para os analitos alvo e padrão interno ROX para análise na matriz leite (continua)

Substância	Massa Monoisotopica, <i>u</i>	Íon precursor, <i>m/z</i>	Íon Produto, <i>m/z</i>	<i>Dwell time</i> , ms	DP, volts (a)	CE, volts (b)	CXP, volts (c)
ERI[M+H] ⁺	733,46	734,56	158,2	50	171	41	14
			576,2			23	18
			116,0			51	14
OLE[M+H] ⁺	687,42	688,39	158,2	50	136	35	20
			544,4			21	18
			116,3			55	14
ROX[M+H] ⁺	836,53	837,46	158,2	50	171	47	16
			679,5			29	22
			116,2			57	16
ROX[M+2H] ²⁺	836,53	419,42	158,0	50	86	21	22
			116,0			33	20
			573,5			13	18

Tabela 7 - Parâmetros do LC - MS/MS para os analitos alvo e padrão interno ROX para análise matriz leite (conclusão)

Substância	Massa Monoisotópica, <i>u</i>	Íon precursor, <i>m/z</i>	Íon Produto, <i>m/z</i>	<i>Dwell time</i> , ms	DP, volts (a)	CE, volts (b)	CXP, volts (c)
ESP[M+H] ⁺	842,51	843,59	174,1	50	171	47	10
			142,1				
			540,4				
ESP[M+2H] ²⁺	842,51	422,37	174,0	50	126	29	30
			144,9				
			540,2				
TILM[M+H] ⁺	868,57	869,58	174,3	50	356	57	12
			696,4				
			126,1				
TILM[M+2H] ²⁺	868,57	435,34	174,0	50	106	33	22
			695,6				
			126,1				
TIL [M+H] ⁺	915,52	916,62	174,1	50	226	49	18
			772,4				
			156,1				

(a) *Declustering Potential*, (b) *Collision Energy*, (c) *Collision Exit Potential*.

Fonte: (COSTA et al., 2015).

3.5 Condições cromatográficas e espectrométricas do método desenvolvido e validado para análise de macrolídeos em fórmulas infantis

O método desenvolvido por Costa (2014) para análise de macrolídeos em leite foi otimizado e validado para a análise dos macrolídeos nas fórmulas infantis. As condições cromatográficas e espectrométricas utilizadas para a análise em fórmulas infantis foram:

- fase móvel A: 0,1% de ácido fórmico em água;
- fase móvel B: 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila;
- fluxo total da fase móvel: 0,3 mL/min;
- temperatura do forno: 40 °C;
- programação de eluição gradiente: O gradiente se iniciou com 75% de fase A durante 1 min, passando para 50% em 9,5 min e 5% de fase A em 9,6 min

mantendo essa composição por 0,4 min. Aos 10,1 min, o eluente A retorna para 75% para reestabelecer a condição inicial até completar 15 min, tempo total de corrida;

f) tempo total de corrida: 15 min;

g) programação do autoamostrador:

→ volume de rinsagem: 500 μ L;

→ profundidade da agulha: 52 mm;

→ velocidade de rinsagem: 35 μ L/s;

→ velocidade de amostragem: 5 μ L/s;

→ tempo de purga: 25 min;

→ tempo de imersão na rinsagem: 10 s;

→ modo de rinsagem: antes e após aspiração;

→ habilitação do sistema de resfriamento: sim;

→ temperatura do sistema de resfriamento: 4°C;

→ controle de profundidade da agulha no *vial*: 45 mm;

→ método de bombeamento: rinsar bomba e pósito entre análises (*Rinse Pump And Port Between Analysis*);

→ tempo de rinsagem: 4 s.

h) interface: eletrospray;

i) modo: MRM positivo;

j) gás de cortina (*Curtain gas*): N₂ valor 10;

k) gás de nebulização (GS1): N₂ valor 55;

l) gás de secagem (GS2): N₂ valor 55;

m) voltagem do *ionspray* (IS): 5000 V;

n) voltagem do potencial de entrada (EP): 10 V;

o) voltagem do detector (CEM): 2500 V;

p) voltagem do defletor (DF): -100 V;

q) temperatura da fonte *TurbolonSpray*: 550°C;

r) gás de colisão (*CAD gas*): N₂ valor 6;

s) *dwel time* variável, conforme Tabela 8; MR *pause* = 5 ms;

t) tempo de aquisição: 15 min.

u) volume de injeção: 10 μ L

Os parâmetros do LC - MS/MS para os analitos alvo estão resumidas na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Parâmetros do LC - MS/MS para os analitos alvo e padrão interno ROX para análise na matriz fórmula infantil

Substância	Massa Monoisotópica, <i>u</i>	Íon precursor, <i>m/z</i>	Íon Produto, <i>m/z</i>	<i>Dwell</i> <i>time</i> , ms	DP, volts (a)	CE, volts (b)	CXP, volts (c)
ERI[M+H] ⁺	733,46	734,56	158,2	100	171	41	14
			576,2			23	18
			116,0			51	14
OLE[M+H] ⁺	687,42	688,39	158,2	100	136	35	20
			544,4			21	18
			116,3			55	14
ROX[M+H] ⁺	836,53	837,46	158,2	50	171	47	16
			679,5			29	22
			116,2			57	16
ROX[M+2H] ²⁺	836,53	419,42	158,0	50	86	21	22
			116,0			33	20
			573,5			13	18
ESP[M+H] ⁺	842,51	843,59	174,1	100	171	47	10
			142,1			45	16
			540,4			41	16
ESP[M+2H] ²⁺	842,51	422,37	174,0	100	126	29	30
			144,9			19	22
			540,2			15	10
TILM[M+H] ⁺	868,57	869,58	174,3	100	356	57	12
			696,4			53	24
			126,1			77	18
TILM[M+2H] ²⁺	868,57	435,34	174,0	100	106	33	22
			695,6			19	22
			126,1			49	26
TIL [M+H] ⁺	915,52	916,62	174,1	100	226	49	18
			772,4			39	24
			156,1			61	22

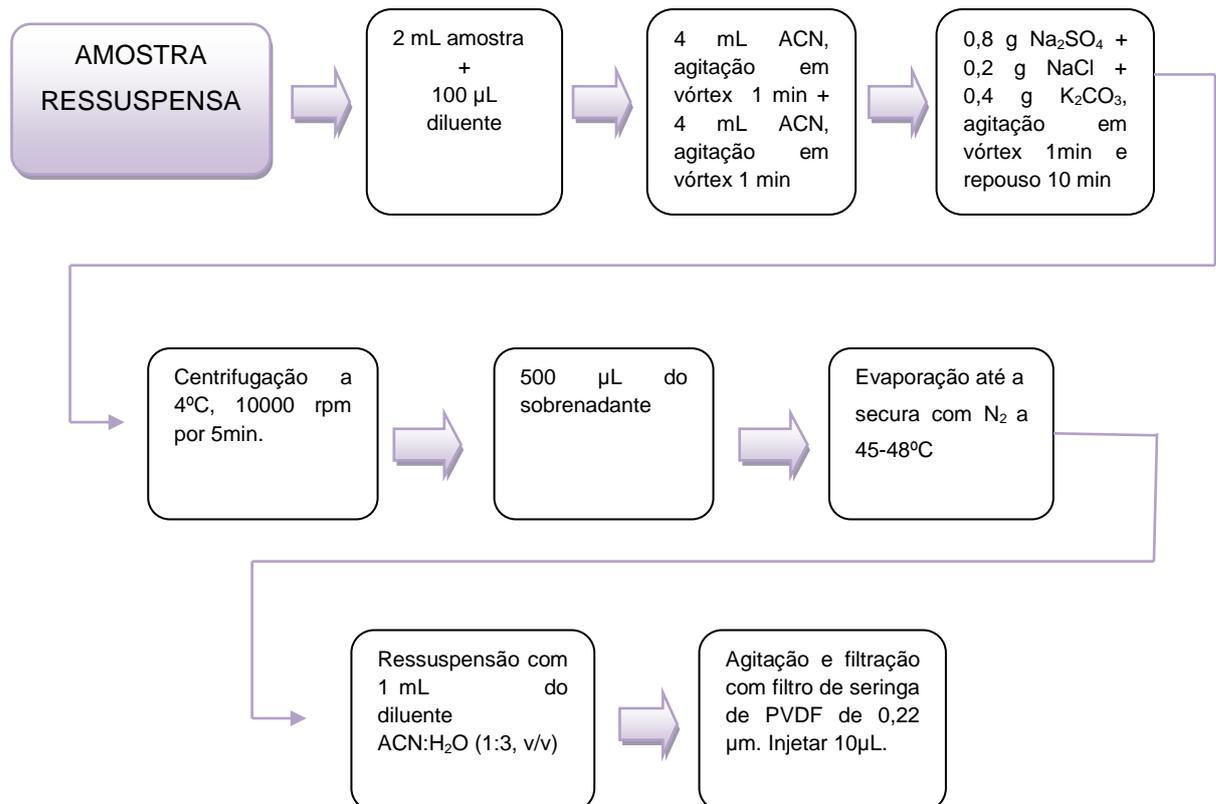
(a) *Declustering Potential*, (b) *Collision Energy*, (c) *Collision Exit Potential*.

Fonte: (Da autora, 2019).

3.6 Método de preparo de amostra QuEChERS para análise de resíduos de macrolídeos em leite e fórmulas infantis

A extração das amostras de leite (estudo de avaliação de aplicabilidade) e de fórmulas infantis foi efetuada segundo método descrito por Costa et al.(2015). A **Figura 8** apresenta o fluxograma.

Figura 8 - Fluxograma do método QuEChERS desenvolvido para análise de leite



Fonte: (Da autora, 2019).

A partir da amostra reconstituída com água purificada tipo 1 e conforme as orientações do fabricante, uma alíquota de 2 mL foi transferida para um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL. Foi padronizado a adição de 100 µL de diluente (acetoneitrila:água, 1:3, v/v) aos 2 mL de amostra para igualar o volume, considerando os casos em que a fortificação no início do procedimento de extração é necessária, com posterior agitação em vórtex por 10 s e repouso por 15 min. Para extração dos analitos foram adicionadas duas porções de 4 mL de acetoneitrila com agitação de 1 min após cada adição. Em seguida, adicionou-se uma mistura de sais composta por 0,8 g de Na_2SO_4 , 0,2 g de NaCl e 0,4 g de K_2CO_3 para a separação das

fases, com posterior agitação por 1 min e repouso por 10 min. Seguiu-se então para a etapa de centrifugação a 4°C e 10.000 rpm por 5 min. 500 µL do sobrenadante foram pipetados e transferidos para um tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL e este volume evaporado até a secura sob fluxo suave de N₂ a 45-48°C. O extrato seco foi ressuspenso com 1 mL do diluente com agitação em vórtex por 1 min e filtrado através de filtro de seringa de PVDF de 0,22 µm para vial âmbar.

Para todas as determinações analíticas, a Roxitromicina foi utilizada como padrão interno qualitativo, ou seja, somente para fins de identificação no cálculo de tempo de retenção relativo. Podemos considerar padrão interno um composto adicionado aos padrões de trabalho e amostras de ensaio que possui características estruturais que se assemelham aos analitos nativos (BRASIL, 2011f).

3.7 Avaliação da aplicabilidade para fórmulas infantis do método analítico desenvolvido e validado em leite por Costa (2014)

A execução e as avaliações dos estudos de aplicabilidade realizados neste trabalho tiveram como base principal os Procedimentos Operacionais Padrões (POP) intitulados “Método de Análise para Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos: Protocolo de Validação N° 65.3120.136” e “Validação das Funções de Calibração usando o Software *Statistica*® 8.0 N° 65.3120.135”, elaborados pelo Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da FIOCRUZ (INCQS, 2015a; INCQS, 2015b). O POP N° 65.3120.136 foi elaborado tendo como referências documentos nacionais e internacionais, principalmente a Decisão 657/2002 da Comissão Europeia e o Manual de Garantia de Qualidade Analítica do MAPA de 2011, ambos guias de orientações específicas para análise de resíduos em produtos de origem animal (UNIÃO EUROPEIA, 2002; BRASIL, 2011e).

O método desenvolvido para análise de macrolídeos em leite foi testado em fórmulas infantis para avaliar a possível alteração do seu desempenho geral. Os parâmetros de linearidade, seletividade e efeito matriz relativo foram avaliados por curvas fortificadas no final da extração com os analitos espiramicina, tilosina e tilmicosina, analitos definidos anteriormente no projeto da dissertação. Efetuou-se o preparo das curvas em 9 níveis de concentração, incluindo o zero, a partir das amostras 002/2018 (amostra de leite em pó), 004/2018 (amostra de fórmula infantil

do tipo 1) e 005/2018 (amostra de fórmula infantil do tipo 2), previamente testadas e confirmadas como amostras brancas, além de uma curva no diluente nas mesmas concentrações. As soluções padrão de trabalho, diluídas a partir das soluções estoque em ACN:H₂O (1:3, v/v) para fortificação no final do procedimento após as extrações foram preparadas nas seguintes concentrações, considerando os LMR estabelecidos para leite:

- a) P0 - Solução contendo ROX (padrão interno) equivalente a 6,25 ng/mL;
- b) P1 - Solução contendo 0,78125 ng/mL (0,125 LMR) de ESP e TIL, 3,125 ng/mL (0,125 LMR) de TILM e 6,25 ng/mL de ROX;
- c) P2 - Solução contendo 1,5625 ng/mL (0,250 LMR) de ESP e TIL, 6,25 ng/mL (0,250 LMR) de TILM e 6,25 ng/mL de ROX;
- d) P3 - Solução contendo 3,125 ng/mL (0,5 LMR) de ESP e TIL, 12,5 ng/mL (0,5 LMR) de TILM e 6,25 ng/mL de ROX;
- e) P4 - Solução contendo 6,25 ng/mL (1 LMR) de ESP e TIL, 25 ng/mL (1 LMR) de TILM e 6,25 ng/mL de ROX;
- f) P5 - Solução contendo 9,375 ng/mL (1,5 LMR) de ESP e TIL, 37,5 ng/mL (1,5 LMR) de TILM e 6,25 ng/mL de ROX;
- g) P6 - Solução contendo 12,5 ng/mL (2 LMR) de ESP e TIL, 50 ng/mL (2 LMR) de TILM e 6,25 ng/mL de ROX;
- h) P7 - Solução contendo 15,625 ng/mL (2,5 LMR) de ESP e TIL, 62,5 ng/mL (2,5 LMR) de TILM e 6,25 ng/mL de ROX;
- i) P8 - Solução contendo 18,75 ng/mL (3 LMR) de ESP e TIL, 75 ng/mL (3 LMR) de TILM e 6,25 ng/mL de ROX.

Os extratos e as soluções-padrão foram injetados em triplicatas aleatórias.

3.7.1 Avaliação da linearidade

A avaliação da linearidade do método em fórmulas infantis foi realizada pela avaliação estatística das curvas de calibração obtidas com a adição dos analitos após a etapa de extração (curva fortificada no final). Inicialmente avaliou-se a presença de valores aberrantes em cada triplicata de injeções de cada nível de concentração através do teste de Grubbs a $\alpha = 0,01$, supondo os valores tenderem à

distribuição normal (**Equação 5**). Com o auxílio do Software *Statistica*[®] 8.0 foi avaliada a homocedasticidade dos dados pelo teste de *Levene* e o ajuste do modelo pelo valor de p gerado através da planilha *Parameter Estimates*.

Considera-se X_n ou X_1 valor aberrante se:

$$|G_{1calc}| = \frac{(X_n - \bar{X})}{s} \text{ ou } \frac{(X_1 - \bar{X})}{s} > G_1 \quad (5)$$

Onde:

s = desvio padrão estimado

G_1 = valor crítico de Grubbs para um valor aberrante em um conjunto de resultados onde $n \geq 3$.

3.7.2 Avaliação da seletividade e do efeito matriz relativo

Para avaliar a presença de potenciais interferentes das diferentes matrizes que poderiam influenciar na resposta do detector foi representado graficamente, através da utilização do software *Analyst*[®], a área dos picos dos analitos no eixo y (vertical) e a concentração no eixo x (horizontal) para as curvas de cada amostra e solução padrão, considerando picos com sinal-ruído ≥ 3 . Utilizando o modelo de regressão definido na avaliação da linearidade (seção 3.7.1), foi calculada a equação do modelo que melhor se ajustou aos pontos para cada amostra e solução padrão. Os coeficientes angulares das funções de calibração foram comparados entre as amostras e posteriormente entre as amostras e a solução padrão. Um desvio-padrão relativo (RSD) de até 15% foi considerado aceitável (INCQS, 2015b).

3.8 Otimização do método analítico para fórmulas infantis tipos 1 e 2

Considerando que o método desenvolvido para leite foi desenvolvido e validado com base no LMR dos macrolídeos nessa matriz e que nas fórmulas infantis a sua presença não deve ser detectada, os níveis de orientação foram adequados. Além disso, alguns ajustes finos foram efetuados para otimizar ainda mais o método, além da inclusão dos analitos eritromicina e oleandomicina, que não

estavam contemplados no projeto original dessa dissertação. Com o intuito de melhorar a integração dos picos, principalmente o da tilmicosina, o *dwell time* de todos os analitos, exceto o da ROX, foi testado no valor de 100 ms o dobro do valor do *dwell time* do método original em leite (COSTA, 2014). Para tentar diminuir o tempo de corrida e assim viabilizar um maior número de injeções por hora, o tempo de reequilíbrio de 5 min foi avaliado em comparação ao tempo de reequilíbrio de 10 min do método original em leite (COSTA, 2014), implicando em uma redução do tempo total de corrida de 20 min para 15 min. Para este teste foi utilizada uma solução de ACN:H₂O (1:3, v/v) com os analitos alvo nas concentrações de 1,25 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 1,25 ng/mL de ROX (padrão interno) preparada a partir da solução estoque.

3.9 Validação do método analítico para fórmulas infantis tipos 1 e 2

Amostras de fórmulas infantis do tipo 1 e 2 comprovadamente não contaminadas com os analitos alvo foram utilizadas para a validação do método.

Os parâmetros avaliados foram intervalo de medição e intervalo linear (função de calibração instrumental), seletividade (incluindo o efeito matriz relativo), linearidade (intervalo linear do método), sensibilidade, efeito matriz absoluto, limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão ($CC\alpha$), capacidade de detecção ($CC\beta$), recuperação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e incerteza de medição. Para a análise dos resultados assumiu-se a densidade das amostras igual a 1.

O planejamento experimental e a avaliação dos resultados de validação para os parâmetros de $CC\alpha$, $CC\beta$, recuperação, precisão e incerteza foram realizados conforme planejamento experimental do software ResVal (v.3, RIKILT *Wageningen University & Research, European Union Community Reference Laboratory, Wageningen*). A avaliação dos demais parâmetros foi feita segundo os POPs N^o 65.3120.135 e 65.3120.136, do Laboratório de Pesquisa de Resíduo de Medicamentos Veterinários em Alimentos, sendo que o POP N^o 65.3120.136 está fundamentado essencialmente na Decisão 657/2002 da Comissão Europeia e no Manual de Garantia de Qualidade Analítica do MAPA de 2011 (INCQS, 2015a; INCQS, 2015b; UNIÃO EUROPEIA, 2002; BRASIL, 2011e).

3.9.1 Preparo de soluções padrão e amostras

As concentrações das soluções para curva no diluente, fortificação no final do procedimento de extração e fortificação no início do procedimento de extração foram definidas baseadas no valor da concentração alvo de 10 ng/mL, uma vez que os analitos pesquisados são utilizados em espécies produtoras de leite, mas LMRs ou tolerâncias ainda não foram estabelecidas para fórmulas infantis (BRASIL, 2012b).

3.9.1.1 Soluções padrão em ACN:H₂O (1:3, v/v) para fortificação no final do procedimento de extração e curva no diluente

As soluções padrão para fortificação no final e curva no diluente foram preparadas nas seguintes concentrações a partir das soluções estoque:

- a) P0 - Solução contendo ROX (padrão interno) equivalente a 1,25 ng/mL;
- b) P1 - Solução contendo 0,3125 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 1,25 ng/mL de ROX;
- c) P2 – Solução contendo 0,625 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 1,25 ng/mL de ROX;
- d) P3 – Solução contendo 1,25 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 1,25 ng/mL de ROX;
- e) P4 – Solução contendo 1,875 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 1,25 ng/mL de ROX;
- f) P5 – Solução contendo 2,5 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 1,25 ng/mL de ROX;
- g) P6 - Solução contendo 3,125 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 1,25 ng/mL de ROX;
- h) P7 - Solução contendo 3,75 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 1,25 ng/mL de ROX;
- i) P8 - Solução contendo 4,375 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 1,25 ng/mL de ROX;
- j) P9 - Solução contendo 5,0 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 1,25 ng/mL de ROX;

3.9.1.2 Soluções padrão em ACN:H₂O (1:3, v/v) para fortificação no início do procedimento de extração

As soluções padrão para fortificação no início foram preparadas nas seguintes concentrações a partir das soluções estoque:

- a) P0 - Solução contendo ROX (padrão interno) equivalente a 200 ng/mL;
- b) P1 - Solução contendo 50 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 200 ng/mL de ROX;
- c) P2 - Solução contendo 100 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 200 ng/mL de ROX;
- d) P3 - Solução contendo 200 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 200 ng/mL de ROX;
- e) P4 - Solução contendo 300 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 200 ng/mL de ROX;
- f) P5 - Solução contendo 400 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 200 ng/mL de ROX;
- g) P6 - Solução contendo 500 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 200 ng/mL de ROX;
- h) P7 - Solução contendo 600 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 200 ng/mL de ROX.
- i) P8 - Solução contendo 700 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 200 ng/mL de ROX.
- j) P9 - Solução contendo 800 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e 200 ng/mL de ROX.

3.9.1.3 Preparo de amostras brancas de reagentes

As amostras brancas de reagentes foram preparadas utilizando água como substituto da amostra branca, livre dos analitos alvo e padrão interno.

Foram pipetados 2,0 mL de água purificada em tubos de centrífuga de polipropileno de 50 mL ao qual foram adicionados 100 µL de ACN: H₂O (1:3, v/v), seguindo com agitação em vórtex por 1 min. Após repouso por 15 min, seguiu-se

com o procedimento de extração a partir da adição de ACN conforme descrito na seção 3.6.

3.9.1.4 Preparo de amostras de fórmulas infantis não contaminadas (branco)

As amostras brancas de fórmulas infantis foram preparadas a partir de amostras sem os analitos alvo e sem padrão interno.

Foram pipetados 2,0 mL de uma amostra de fórmula infantil, livre dos analitos alvo (amostra branca) em um tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL e adicionados 100 µL de ACN: H₂O (1:3, v/v), seguindo com agitação em vórtex por 1 min. Após repouso por 15 min, seguiu-se com o procedimento de extração a partir da adição de ACN conforme descrito na seção 3.6.

3.9.1.5 Preparo de amostras de fórmulas infantis fortificadas no final do procedimento de extração

As amostras de fórmulas infantis foram fortificadas após o procedimento de extração com as soluções padrão em ACN:H₂O (1:3, v/v) para fortificação no final descritas na seção 3.9.1.1.

Foram pipetados 2,0 mL de uma amostra de fórmula infantil, livre dos analitos alvo (amostra branca) em um tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL e adicionados 100 µL de solução de ACN:H₂O (1:3, v/v), seguindo com agitação em vórtex por 1 min. Após repouso por 15 min, seguiu-se com o procedimento de extração a partir da adição de ACN conforme descrito na seção 3.6 até a etapa de ressuspensão. A ressuspensão foi feita com 1 mL de solução padrão de fortificação no final, seguindo com a agitação em vórtex por 1 min e filtração com filtro de seringa de PVDF de 0,22 µm.

3.9.1.6 Preparo de amostras de fórmulas infantis fortificadas no início do procedimento de extração

As amostras de fórmulas infantis foram fortificadas antes do procedimento de extração com as soluções padrão em ACN:H₂O (1:3, v/v) para fortificação no início descritas na seção 3.9.1.2.

Foram pipetados 2,0 mL de uma amostra de fórmula infantil, livre dos analitos alvo (amostra branca) em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL e adicionados 100 µL da solução de fortificação, seguindo com agitação em vórtex por 1 min. Após repouso por 15 min, seguiu-se com o procedimento de extração a partir da adição de ACN conforme descrito na seção 3.6.

3.9.2 Seletividade (incluindo efeito matriz relativo)

A seletividade foi avaliada por meio de 20 amostras brancas para investigar a presença de sinais interferentes na região de eluição do analito e verificação da capacidade do método de diferenciar os analitos dos componentes da matriz (UNIÃO EUROPEIA 2002; BRASIL, 2011e). Uma solução controle em P3 contendo os analitos alvo nas concentrações de 1,25 ng/mL de ERI, ESP, OLE, TIL e TILM e de 1,25 ng/mL de ROX como padrão interno foi injetada para ser usada como referência para identificação das regiões de eluição dos analitos.

Para avaliar se interferentes não detectáveis da matriz influenciavam na resposta do detector foram construídas curvas de calibração para cada uma das 6 amostras brancas (004/2018, 012/2018, 014/2018, 027/2018, 028/2018 e 029/2018) fortificadas com todos os analitos alvo no final do procedimento de extração, em 6 níveis de concentração distintos com soluções de fortificação no final (P2 a P7 da seção 3.9.1.1), incluindo o nível zero (somente com o padrão interno). O preparo das amostras foi feito segundo a seção 3.9.1.5.

Cada amostra representativa foi também extraída como amostra branca, sem a adição de nenhum analito, além da extração de uma amostra branca de reagente, conforme seção 3.9.1.3 e 3.9.1.4, respectivamente.

Soluções padrão dos analitos nas mesmas concentrações também foram injetadas para a construção da curva de calibração no diluente (seção 3.9.1.1). A concentração de 10 µg/L estabelecida como concentração alvo foi um dos seis níveis utilizados para a fortificação e a concentração selecionada para fortificação com padrão interno. A injeção foi realizada em triplicata aleatória.

Os dados gerados foram representados graficamente, através da utilização do software Analyst[®], sendo a área dos picos dos analitos plotada no eixo y (vertical) e a concentração no eixo x (horizontal) para as curvas de cada amostra e solução padrão, considerando somente picos com sinal-ruído ≥ 3 e incluindo seu respectivo

branco. Utilizando o modelo de regressão pelo método dos mínimos quadrados foi calculada a equação do modelo que melhor se ajustou aos pontos para cada amostra e solução padrão. Os coeficientes angulares das funções de calibração foram comparados entre as amostras e posteriormente entre as amostras e a solução padrão. Um desvio-padrão relativo (RSD) de até 15% foi considerado aceitável (INCQS, 2015b).

3.9.3 Intervalo de medição e intervalo linear instrumental

O intervalo de medição e o intervalo linear foi avaliado por meio da construção de curvas de calibração para cada analito com nove níveis de concentração no solvente de reconstituição ou diluente ACN:H₂O (1:3, v/v), e mais o ponto zero, com a adição do padrão interno ROX (conforme seção 3.9.1.1). As concentrações dos analitos alvo foram equivalentes a 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 e 3,5 e 4 vezes a concentração alvo. As soluções-padrão foram injetadas em triplicata aleatória.

Foram considerados para a avaliação somente picos com razão sinal/ruído ≥ 10 para a primeira transição (transição de quantificação) e para a segunda transição (transição de confirmação).

A análise estatística dos dados iniciou-se pela avaliação da presença de valores aberrantes, em cada conjunto de repetições em cada nível de concentração, empregando-se o teste de *Grubbs* a $\alpha = 0,01$, considerando que os dados são provenientes de uma distribuição normal.

As curvas de calibração foram avaliadas por meio do uso do software *Statistica*[®] 8.0 e a avaliação da homocedasticidade dos dados, ou seja, se as variâncias foram constantes ao longo do intervalo de medição, foi realizada pelo teste de Levene por se tratar de um teste paramétrico menos sensível à premissa da normalidade.

A curva foi refeita e avaliada em mais dois dias distintos.

3.9.4 Linearidade (intervalo linear do método), sensibilidade e efeito matriz absoluto

Uma amostra de fórmula infantil representativa, comprovadamente branca (012/2018), foi selecionada como a matriz para a construção das curvas de calibração fortificadas no início e no final do procedimento de extração com os

analitos alvo para fins de avaliação da linearidade, sensibilidade e efeito matriz absoluto.

As análises estatísticas das curvas de calibração de cada analito alvo obtidas com a fortificação na matriz no início do procedimento foram realizadas por meio do software *Statistica*[®] 8.0 para a verificação da linearidade e sensibilidade do método. As curvas na matriz obtidas através da adição dos analitos alvo após as etapas de extração (fortificação no final do procedimento) também foram avaliadas estatisticamente. As curvas fortificadas no final e no início do procedimento de extração contemplaram 9 níveis de concentração e mais um nível zero (P0 a P9) por meio da utilização das soluções para fortificação conforme descritas nas seções 3.9.1.1 e 3.9.1.2, respectivamente. O preparo das amostras foi feito conforme seções 3.9.1.5 e 3.9.1.6.

O efeito matriz absoluto do método foi verificado considerando a possibilidade dos fenômenos de supressão ou aumento de sinal na ionização, uma vez que utilizou-se a técnica analítica de LC-MS/MS. O estudo foi feito por meio da comparação da curva de calibração de cada analito alvo obtida com solução padrão (curva no diluente), com a curva obtida por meio da adição dos analitos alvo após as etapas de extração, ou seja, a fortificação da matriz representativa das fórmulas infantis foi feita no final do procedimento de extração. As análises estatísticas das curvas para cada analito alvo foram feitas através do software *Statistica*[®] 8.0. As curvas de calibração de cada analito alvo contemplaram 9 níveis de concentração e mais um nível zero (P0 a P9) e o preparo das soluções se deu conforme seção 3.9.1.1.

Empregou-se o teste de *Grubbs* a $\alpha = 0,01$, considerando que os dados são provenientes de uma distribuição normal, para a avaliação da presença de valores aberrantes, em cada conjunto de repetições, em cada nível de concentração.

Foram preparadas uma amostra controle branca de reagente e uma amostra controle branca de fórmula infantil de acordo com a seção 3.9.1.3 e 3.9.1.4. Todas as injeções foram efetuadas em triplicata aleatória.

3.9.5 Recuperação, repetibilidade, precisão intermediária, $CC\alpha$, $CC\beta$, incerteza de medição, LOQ e LOD

O método foi validado de acordo com a Decisão 657/2002, da União Europeia (2002). Os parâmetros de LOD e LOQ, não preconizados nesse documento, foram também calculados.

Os experimentos de validação para obtenção dos parâmetros de recuperação, repetibilidade, precisão intermediária, $CC\alpha$, $CC\beta$ e incerteza de medição foram efetuados e avaliados com o uso do software ResVal v.3 adquirido do laboratório de controle de resíduos RIKILT (Wageningen, The Netherlands). O desenho adotado do estudo foi baseado na metodologia alternativa de validação.

Foram realizados 3 experimentos de forma repetida, em 3 dias, com operadores distintos, nos quais utilizou-se 6 amostras de fórmulas infantis de 3 diferentes fontes de matriz (004/2018, 012/2018, 014/2018, 027/2018, 028/2018 e 029/2018) já testadas anteriormente e consideradas amostras comprovadamente brancas. O número reduzido de fontes de matriz foi devido à dificuldade de se obter matrizes brancas (amostras não contaminadas) de fontes variadas.

As 6 amostras reconstituídas foram fortificadas no início do procedimento, anteriormente à extração, com os analitos nos níveis de concentração de 1, 2 e 3 vezes a concentração alvo, que foi definida em 5 ng/mL. Foram utilizadas as soluções para fortificação no início em P2, P3 e P4 da seção 3.9.1.2, correspondentes às concentrações 5 ng/mL, 10 ng/mL e 15 ng/mL, respectivamente. Além das amostras fortificadas foi preparada uma amostra branca de cada uma das 6 amostras de fórmula infantil e uma amostra branca de reagentes. Os procedimentos foram efetuados segundo as seções 3.9.1.3, 3.9.1.4 e 3.9.1.6 e as injeções feitas em triplicata aleatória.

Para quantificar as 18 amostras fortificadas no início do procedimento foram construídas curvas de calibração na matriz representativa (012/2018), com a fortificação no início do procedimento, com 6 níveis de concentração, além do zero. As soluções para fortificação foram as equivalentes aos níveis de P0 a P6 da seção 3.9.1.2. Para o preparo das amostras fortificadas no início, os procedimentos foram efetuados segundo a seção 3.9.1.6 e as injeções efetuadas em triplicata aleatória.

Anteriormente ao lançamento dos valores da validação para os cálculos no software ResVal foi avaliada a presença de valores aberrantes no conjunto dos

dados em cada um dos 3 níveis das amostras fortificadas no início pelo teste de Grubbs, no nível de significância de $\alpha = 0,01$.

O cálculo do LOD foi realizado por extrapolação, considerando a relação sinal/ruído ≥ 3 dos sinais instrumentais nas transições de confirmação para atender aos critérios de identificação/confirmação preconizados (UNIÃO EUROPEIA, 2002). Os valores foram obtidos a partir dos dados das 18 amostras (6 fontes diferentes) analisadas em três dias diferentes, por operadores diferentes (condições de precisão intermediária) no menor nível de fortificação estudado (5 ng/mL).

O cálculo do LOQ foi realizado por extrapolação de forma semelhante ao LOD, porém considerando a relação sinal/ruído ≥ 10 dos sinais instrumentais nas transições de confirmação para atender aos critérios de identificação/confirmação preconizados (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

Para estimar valores de relação sinal/ruído foi utilizado o software Analyst[®] pela técnica de pico a pico (*S-to-N using Peak-to-Peak*).

3.9.6 Verificação dos valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$

Para verificar se os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ para ERI, ESP, OLE e TIL gerados pelo software ResVal e o valor calculado de $CC\alpha$ e $CC\beta$ para TILM segundo orientações do MAPA (BRASIL, 2011e) eram factíveis, 6 amostras comprovadamente brancas (004/2018, 012/2018, 014/2018, 027/2018, 028/2018 e 029/2018) dos analitos pesquisados, de diferentes fontes de matriz, foram fortificadas no início do procedimento (anterior à etapa de extração) nas concentrações equivalentes ao $CC\alpha$ e $CC\beta$ calculados.

Picos nos tempos de retenção característicos, presentes nas duas transições mais intensas, foram avaliados quanto à razão sinal/ruído superior ou igual a 3,0. Para esta avaliação foi utilizada a técnica para estimar sinal/ruído pelo software Analyst[®] pela técnica de pico a pico (*S-to-N using Peak-to-Peak*).

3.9.6.1 *Preparo das amostras fortificadas no início do procedimento de extração na concentração de $CC\alpha$*

Cada alíquota de 2,0 mL de amostra foi transferida para um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL, no qual foram adicionados 100 μ L da solução

de fortificação com as concentrações equivalentes ao CC α , seguindo com agitação em vórtex por 1 min. Após repouso por 15 min seguiu-se com o procedimento de extração a partir da adição de ACN conforme descrito na seção 3.6. As injeções foram feitas em triplicata aleatória.

3.9.6.2 Preparo das amostras fortificadas no início do procedimento de extração na concentração de CC β

Cada alíquota de 2,0 mL de amostra foi transferida para um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL, no qual foram adicionados 100 μ L da solução de fortificação com as concentrações equivalentes ao CC β , seguindo com agitação em vórtex por 1 min. Após repouso por 15 min seguiu-se com o procedimento de extração a partir da adição de ACN conforme descrito na seção 3.6. As injeções foram feitas em triplicata aleatória.

Uma amostra branca de reagente também foi preparada de acordo com a seção 3.9.1.3.

3.9.6.3 Preparo das soluções controle nas concentrações de CC α e CC β

Foram preparadas duas soluções controle, uma contendo os analitos nas concentrações equivalentes ao CC α e outra solução contendo os analitos nas concentrações equivalentes ao CC β . As injeções foram feitas em triplicata.

3.10 Avaliação da ocorrência de espiramicina, eritromicina, oleandomicina, tilosina e tilmicosina em fórmulas infantis para lactentes (tipo 1) e de seguimento para lactentes (tipo 2)

Todas as amostras descritas na seção 3.3, com exceção da 005/2018 e 012/2018, foram analisadas pelo método validado, com o objetivo de avaliar a presença dos macrolídeos ESP, ERI, OLE, TIL e TILM. Para cada lote de análise foram processadas 15 amostras, uma curva de calibração em amostra branca representativa (012/2018) e quatro amostras de controle de processo (uma amostra branca de reagente, duas alíquotas da amostra branca representativa fortificada no início e uma amostra fortificada no final da extração na amostra representativa).

3.10.1 Preparo das amostras

As amostras de fórmulas infantis foram preparadas conforme indicação do rótulo para um volume de 30 mL de água deionizada, de acordo com a **Tabela 9**.

Para cada amostra foram analisadas 2 alíquotas verdadeiras, ou seja, alíquota preparadas e extraídas de forma independente.

Cada alíquota de 2,0 mL de amostra de fórmula infantil reconstituída foi pipetada em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL, no qual foram adicionados 100 µL de solução de ROX a 200 ng/mL, seguindo com agitação em vórtex por 1 min. Após repouso por 15 min, seguiu-se com o procedimento de tratamento da amostra conforme descrito na seção 3.6.

Tabela 9 - Massa (g) de fórmulas infantis para reconstituição com 30 mL de água deionizada

Fabricante / Marca	Massa (g) para fórmulas	
	tipo 1	tipo 2
1 / A	4,6	4,9
1 / B	4,4	4,6
2 / A	4,3	4,7
3 / A	4,4	4,7
3 / B	4,5	4,7

Fonte: (Da autora, 2019).

Legenda: Elaboração baseada nos rótulos dos produtos analisados.

3.10.2 Preparo da curva de calibração

A curva de calibração utilizada para quantificar os analitos nas amostras foi preparada com fortificação no início do procedimento empregando uma matriz branca representativa (012/2018) e contemplou seis níveis de concentração, além do ponto zero (P0 a P6). As concentrações dos analitos e o preparo das soluções foram feitos conforme descrito a seguir. Não foi necessária a curva para TILM, uma vez que o analito não é quantificável pelo método validado. As amostras foram preparadas conforme procedimento descrito na seção 3.9.1.6.

Uma amostra branca de reagentes e uma amostra branca de fórmula infantil foram preparadas conforme procedimento descrito nas seções 3.9.1.3 e 3.9.1.4, respectivamente.

As soluções padrão para fortificação no início foram preparadas nas seguintes concentrações a partir das soluções estoque:

- a) P0 - Solução contendo ROX (padrão interno) equivalente a 200 ng/mL;
- b) P1 - Solução contendo 50 ng/mL de ERI, ESP, OLE e TIL e 200 ng/mL de ROX;
- c) P2 - Solução contendo 100 ng/mL de ERI, ESP, OLE e TIL e 200 ng/mL de ROX;
- d) P3 - Solução contendo 200 ng/mL de ERI, ESP, OLE e TIL e 200 ng/mL de ROX;
- e) P4 - Solução contendo 300 ng/mL de ERI, ESP, OLE e TIL e 200 ng/mL de ROX;
- f) P5 - Solução contendo 400 ng/mL de ERI, ESP, OLE e TIL e 200 ng/mL de ROX;
- g) P6 - Solução contendo 500 ng/mL de ERI, ESP, OLE e TIL e 200 ng/mL de ROX;

3.10.3 Preparo da amostra fortificada no início do procedimento de extração na concentração de CC α

Duas alíquotas verdadeiras foram preparadas a partir da amostra branca representativa (012/2018) e fortificadas no início do procedimento de extração na concentração de CC α para os analitos alvo (16,4 ng/mL de ERI, 87,6 ng/mL de ESP, 19,8 ng/mL de OLE, 51,36 ng/mL de TIL e 90 ng/mL de TILM) e de 200 ng/mL para o padrão interno ROX.

Cada alíquota de 2,0 mL de amostra foi pipetada em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL, no qual foi adicionado 100 μ L da solução de fortificação com as concentrações de CC α , seguindo com agitação em vórtex por 1 min. Após repouso por 15 min, seguiu-se com o procedimento de extração a partir da adição de ACN conforme descrito na seção 3.6.

3.10.4 Preparo da amostra fortificada no final do procedimento de extração na concentração de CC α

A amostra branca representativa (012/2018) foi fortificada no final do procedimento de extração na concentração equivalente ao CC α no extrato final para injeção para os analitos alvo (0,102 ng/mL de ERI, 0,547 ng/mL de ESP, 0,124 ng/mL de OLE, 0,321 ng/mL de TIL e 0,562 ng/mL de TILM) e de 1,25 ng/mL para o padrão interno ROX.

Foi pipetado 2,0 mL da amostra em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL no qual foi adicionado 100 μ L de solução de ACN:H₂O (1:3, v/v), seguindo com agitação em vórtex por 1 min. Após repouso por 15 min, seguiu-se com o procedimento de extração a partir da adição de ACN conforme descrito na seção 3.6 até a etapa de ressuspensão. A ressuspensão foi feita com 1 mL de solução padrão de fortificação no final, seguindo com a agitação em vórtex por 1 min e filtração em filtro de seringa de PVDF de 0,22 μ m.

Para cada rodada de análise a sequência de injeções foi da seguinte forma:

- diluente, em duplicata;
- amostra controle branca de reagentes;
- Solução controle no CC α (a mesma utilizada para fortificação no final), injeção em duplicata;
- diluente;
- curva de calibração na matriz com fortificação no início, injeção em duplicata aleatória;
- diluente;
- amostra controle branca de fórmula infantil;
- amostra controle fortificada em CC α no início do procedimento (alíquota 1 e 2);
- amostra controle fortificada em CC α no final do procedimento;
- diluente;
- 15 amostras para ensaio, sendo as injeções para cada alíquota em duplicata;
- amostra controle branca de fórmula infantil;
- amostra controle fortificada em CC α no início do procedimento (alíquota 1 e 2);
- amostra controle fortificada em CC α no final do procedimento.

3.10.5 Identificação e quantificação dos analitos

A presença dos cinco analitos foi avaliada nas fórmulas infantis segundo os critérios da Decisão 2002/657/EC para identificação e confirmação (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

Três transições para cada analito foram monitoradas. A transição mais intensa no modo MRM foi selecionada para quantificação e a segunda mais intensa foi utilizada para confirmação. Segundo a Decisão 2002/657/EC, o monitoramento de um íon precursor e dois íons produto para cada analito resulta em quatro pontos

de identificação, o suficiente para a detecção de substâncias proibidas e superior ao mínimo necessário para a detecção de substâncias autorizadas por LC - MS/MS (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

Foram considerados detectados os analitos que atenderam aos três critérios para a identificação e confirmação:

→ Relação sinal/ruído: Picos nos tempos de retenção característicos, presentes nas duas transições mais intensas, ambos com relação sinal/ruído superior ou igual a 3,0. Para esta avaliação foi utilizada a técnica para estimar sinal/ruído pelo software Analyst® pela técnica de pico a pico (*S-to-N using Peak-to-Peak*);

→ Tempo de retenção relativo (t_{Rel}): O tempo de retenção relativo referente ao tempo de retenção do analito alvo e o do padrão interno ROX na amostra, deve estar de acordo com o tempo de retenção relativo daquele obtido na amostra controle com fortificação no final do procedimento, com os analitos alvo na concentração equivalente ao CC α e com o padrão interno ROX, com uma margem de erro de $\pm 2,5 \%$.

→ Razão de íons: a razão da intensidade de sinal (área) entre os picos correspondentes às duas transições (par íon precursor / íon produto) mais intensas na amostra não deverá exceder a tolerância máxima permitida para a intensidade relativa em relação à mesma razão na amostra controle com fortificação no final do procedimento, com os analitos alvo na concentração equivalente ao CC α e com o padrão interno ROX. As tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas de sinal de íons para LC-MSⁿ estão descritas na **Tabela 10**.

O cálculo da razão de íons foi efetuado da seguinte maneira:

$$\text{Razão de íons} = \frac{\text{Área da transição de confirmação}}{\text{Área da transição de quantificação}}$$

Tabela 10 - Tolerância máxima permitida para as intensidades relativas de sinal de íons para LC- MSⁿ

Intensidade relativa	Varição aceitável
>50%	$\pm 20\%$
>20 - 50%	$\pm 25\%$
>10 - 20%	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$

Fonte: (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

A quantificação dos analitos ERI, ESP, OLE e TIL nas amostras foi realizada por interpolação na curva de calibração na matriz, obtida para cada substância, pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP), com peso equivalente a $1/y$, empregando o software Analyst®.

3.11 Avaliação da exposição dietética

A avaliação de exposição foi feita por meio da abordagem determinística pontual mais refinada recomendada pela FAO/OMS (2009b) e empregada pelo JECFA para avaliação de triagem. Foram considerados lactentes que fazem uso exclusivo de fórmulas infantis (0 - 6 meses) e lactentes que fazem uso de fórmulas infantis de forma complementar (6 - 11 meses e 29 dias) em dois diferentes cenários de consumo.

No primeiro cenário, considerou-se o consumo de fórmula infantil nos casos em que são seguidas as referências para uso presentes nos rótulos estabelecidos para cada produto específico (**Tabela 11 e 12**). Neste caso, foram feitas avaliações diferenciadas para meninos e meninas em cada faixa etária. O peso corporal foi obtido dos valores estabelecidos para os pesos médios dos padrões de crescimento para meninos e meninas determinados pela OMS como mostrado na **Tabela 13**. Esses padrões são resultantes de um Estudo de Referência de Crescimento Multicêntrico da OMS (WHO, 2006).

No segundo cenário, considerou-se o consumo padrão de fórmula infantil segundo a OMS, estabelecido na dieta modelo atual, que define um consumo diário de 0,75 litros de fórmula infantil por um lactente de 3 meses e 5 kg (FAO/WHO, 2012). Para este cenário, a avaliação de exposição foi realizada apenas para amostras de fórmulas infantis do tipo 1 (0-6 meses).

Tabela 11 - Guias de referência para preparos das fórmulas infantis tipo 1 e 2 presentes nos rótulos

Fabricante/ Marca	Tipo de fórmula	Idade do lactente	Água (mL)	Número de medidas rasas	Número de mamadas por dia	Quantidade de produto pronto para consumo (mL) ^(a)
1 / A e B	Tipo 1	1 ^a e 2 ^a Semanas	90	3	6	100
		3 ^a e 4 ^a Semanas	120	4	5	130
		2 ^o Mês	150	5	5	170
		3 ^o Mês	180	6	5	200
		4 ^o e 5 ^o Mês	210	7	4	230
	Tipo 2	A partir do 6 ^o mês	210	7	3-4	230
2 / A	Tipo 1	0 - 2 Semanas	90	3	6	100
		2 - 4 Semanas	120	4	5 - 6	130
		1 - 2 Meses	150	5	5	170
		2 - 4 Meses	180	6	4 - 5	200
		4 - 6 Meses	210	7	4	230
	Tipo 2	6 - 8 meses	210	7	3	230
		Após 8 ^o mês	210	7	2 - 3	230
3 / A e B	Tipo1	1 ^a e 2 ^a Semanas	90	3	6	100
		3 ^a e 4 ^a Semanas	120	4	5	130
		2 ^o Mês	150	5	5	170
		3 ^o e 4 ^o Mês	180	6	5	200
		5 ^o e 6 ^o Mês	210	7	5	230
	Tipo 2	6 ^o mês	210	7	5	230
		Após 6 ^o mês	210	7	4 - 3	230

^(a) Valores baseados exclusivamente nos rótulos do fabricante 2.

Fonte: (Da autora, 2019).

Legenda: Elaboração baseada nos rótulos dos produtos analisados.

Tabela 12 - Massa (g) correspondente a uma medida rasa

Fabricante / Marca	Massa (g) da medida rasa das fórmulas tipo 1	Massa (g) da medida rasa das fórmulas tipo 2
1 / A	4,6	4,9
1 / B	4,4	4,6
2 / A	4,3	4,7
3 / A	4,4	4,7
3 / B	4,5	4,7

Fonte: (Da autora, 2019).

Legenda: Elaboração baseada nos rótulos dos produtos analisados.

Tabela 13 - Peso médio dos padrões de crescimento para meninas e meninos, conforme idade do lactente (0 a 11 meses)

Idade do Lactente	Peso médio para meninas (kg)	Peso médio para meninos (kg)
0 semana	3,200	3,300
1 semana	3,300	3,500
2 semanas	3,600	3,800
3 semanas	3,800	4,100
4 semanas	4,200	4,500
2 meses	5,100	5,600
3 meses	5,800	6,400
4 meses	6,400	7,000
5 meses	6,900	7,500
6 meses	7,300	7,900
7 meses	7,600	8,300
8 meses	7,900	8,600
9 meses	8,200	8,900
10 meses	8,500	9,200
11 meses	8,700	9,400

Fonte: (WHO, 2006).

O volume após reconstituição foi estabelecido a partir de informações do fabricante 2, pois foi o único a apresentar este dado em seus rótulos.

Para as amostras de fórmulas infantis que pertenciam ao mesmo fabricante e à mesma marca simultaneamente, primeiro foi considerada a mediana das concentrações de cada resíduo para os diferentes lotes para o cálculo da exposição diária. Posteriormente foi feito também o cálculo da exposição diária considerando o pior caso, ou seja, a maior concentração nos diferentes lotes. A avaliação de

exposição dietética diária foi estimada de uma forma global (sem distinção de marca) e separadamente para cada marca, considerando mães que são fiéis à marca.

A partir desses dados foram calculadas as estimativas de exposição dietética diária por meio da **Equação 6**:

$$\text{Exposição Diária (mg/kg)} = \frac{\text{consumo diário de fórmula infantil (mL)} \times \text{concentração do resíduo (ng/mL)}}{\text{peso corporal (Kg)}} \times 10^{-6} \quad (6)$$

Os resultados dos cálculos da exposição diária já convertidos para mg/kg foram comparados aos valores de IDA para a ESP (0 - 0,05 mg/kg), ERI (0 - 0,0007 mg/kg), TILM (0 - 0,04 mg/kg) e TIL (0 - 0,03 mg/kg), exceto para a OLE, uma vez que não há IDA estabelecida. A partir dos valores gerados foram calculadas as porcentagens do quanto os resultados das exposições diárias representaram sobre os valores de IDA (FAO/WHO, 2016b; FAO/WHO, 2018b; WHO, 2019). O risco foi considerado aceitável quando a exposição diária foi menor ou igual à IDA.

Nos casos em que os resultados de concentração do resíduo não foram quantificáveis (< LOQ) foram adotados os valores de LOQ/2, e para resultados não detectáveis (< LOD), foram adotados LOD/2, segundo as orientações da FAO/WHO (FAO/WHO, 2009b; FAO/WHO, 2012). Para as amostras que foram confirmadas para TILM, o valor adotado para concentração do resíduo foi o LOD, com base no LOD determinado no dia do ensaio, a partir de amostras controles fortificadas no valor de CC α , uma vez que o método não demonstrou boa precisão na validação. Vale ressaltar que houve uma pequena variação de LOD nos dois dias de ensaio, sendo assim para fórmulas infantis do tipo 1, todas analisadas no primeiro dia, o LOD foi de 0,39 ng/mL e para fórmulas infantis do tipo 2, todas analisadas no 2º dia de ensaio, o LOD foi de 0,30 ng/mL.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da aplicabilidade do método em fórmulas infantis

Para avaliar se o método para a análise de macrolídeos na matriz leite desenvolvido por Costa (2014) era aplicável à matriz fórmula infantil efetuou-se uma comparação de resultados nas duas matrizes, de forma a verificar se poderia ser considerada uma ampliação do escopo do procedimento analítico validado para leite. Os resultados da comparação dos parâmetros avaliados nas duas matrizes estão apresentados a seguir.

4.1.1 Avaliação da linearidade

As amostras de leite em pó (002/2018), de fórmula infantil do tipo 1 (004/2018) e fórmula infantil do tipo 2 (005/2018) foram avaliadas previamente e não apresentaram sinais característicos dos analitos alvo nos tempos de retenção característicos, demonstrando serem brancos.

A linearidade do detector na presença da matriz foi avaliada, uma vez que as amostras foram fortificadas no final do procedimento, após a extração. Para fins de comparação, foi feita também a curva no diluente. Para todos os três analitos os picos das transições de quantificação e confirmação (vide **Tabela 7**) apresentaram relação sinal/ruído foi ≥ 3 no menor nível estudado, sendo assim, a menor concentração estudada foi considerada o limite inferior do intervalo de medição (INCQS, 2013b).

A análise empregando-se o teste de Grubbs a $\alpha = 0,01$ para verificação da presença de aberrantes não identificou valores para serem excluídos e a totalidade dos dados foi lançada no programa *Statística*[®] 8.0.

O teste de Levene realizado pelo software *Statística*[®] 8.0 indicou heterogeneidade das variâncias para os três analitos pesquisados nas curvas de calibração no diluente, no leite e nas fórmulas infantis tipos 1 e 2, exceto para tilmicosina e tilosina na curva da fórmula infantil tipo 1, nas quais as variâncias foram homogêneas. A heterogeneidade das variâncias implica que o uso do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) não é adequado e considerando a necessidade de comparação, o ajuste para todas as curvas foi feito com o Método

dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP) com peso $1/y$, conforme vem sendo adotado pelo Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos do INCQS.

Os cálculos da planilha *Parameter Estimates* do software *Statistica*[®] 8.0, permitem a avaliação do ajuste dos modelos linear de primeira ordem (MMQP) e polinomial de segunda ordem através do valor de p gerado. Para todos os analitos o valor de p do modelo de primeira ordem foi mais significativo e não foi identificado desvio da linearidade do modelo de primeira ordem (MMQP) considerando a curva no diluente e nas matrizes da fórmula infantil 1 e 2, com retirada do último nível de concentração. Neste caso, a regressão pelo MMQP indicou ser adequada e o intervalo linear do detector na presença de matriz foi de 0,125 a 2,5 LMR estabelecido para leite. Contudo, para a matriz leite o ajuste foi linear apenas para os analitos TIL e ESP. O analito TILM apresentou desvio de linearidade do modelo de primeira ordem, sendo melhor ajustado no modelo polinomial de segunda ordem.

4.1.2 Avaliação da seletividade e do efeito matriz relativo

As três amostras analisadas se mostraram livres de picos na região de eluição dos analitos pesquisados.

A fim de verificar se diferentes interferentes não detectáveis poderiam influenciar na resposta do detector e conseqüentemente na quantificação dos analitos, as curvas de calibração obtidas com as 3 diferentes fontes de matriz foram avaliadas pelo cálculo do desvio padrão relativo (RSD) dos coeficientes angulares. Também foram avaliadas as curvas de calibração dos analitos no diluente com a finalidade de observar o efeito de matriz.

A partir do resultado da avaliação da linearidade, selecionou-se o MMQP com peso $1/y$ para o ajuste das curvas obtidas em matriz (fórmulas infantis e leite) e solução padrão e os coeficientes angulares das funções de calibração foram comparados entre as amostras e entre as amostras e a solução padrão. Os valores de RSD estão dispostos na **Tabela 14**.

Tabela 14 - RSDs obtidos para avaliação de efeito matriz relativo

Analitos	RSD (comparação entre as amostras)	RSD (Comparação entre as amostras e a solução padrão)
ESP	20,2	16,5
TIL	5,71	4,67
TILM	55,1	43,9

Fonte: Fonte: (Da autora, 2019).

De uma forma geral foi observada uma supressão maior na curva do leite quando comparada com as demais (diluyente e fórmulas infantis), porém para o analito tilosina o RSD entre as diferentes matrizes e entre as matrizes e o diluyente apresentou valores abaixo de 15%, indicando que não foi possível afirmar que as diferentes matrizes não respondem da mesma forma devido aos seus constituintes diferenciados e que os constituintes das amostras não alteraram a resposta instrumental em relação à solução padrão. Diferentemente, para os analitos espiramicina e tilmicosina, os valores de RSD entre os coeficientes angulares, ultrapassaram 15% tanto na comparação entre as matrizes, quanto entre as matrizes e a solução padrão, demonstrando que as amostras avaliadas não responderam da mesma forma devido aos interferentes diferenciados da matriz e que portanto, não é possível considerar que as fórmulas infantis podem representar uma ampliação do escopo do método, com todas as características para as quais foi desenvolvido. Por esse motivo concluiu-se que era necessária a validação do método analítico para a matriz fórmula infantil.

4.2 Otimização do método analítico para fórmulas infantis tipos 1 e 2

Considerando que seria necessário validar o método analítico para a matriz fórmula infantil alguns ajustes foram feitos a fim de otimizar o método antes da validação. Além disso foi necessário adequar os níveis de concentração, uma vez que o método para leite considerou como concentrações alvo os valores de LMR. Adotou-se como concentração alvo para as fórmulas infantis o nível de 10 ng/mL, considerando que não há tolerâncias estabelecidas para macrolídeos nessa matriz (BRASIL, 2012b).

A seleção de um *dwell time* de 100 ms para todos os analitos, exceto para a ROX, para a qual foi mantido o valor de 50 ms, melhorou o perfil dos picos (**Figura 9**), mas praticamente não alterou as médias e os desvios padrão relativos (RSD%) das áreas dos picos quando comparados aos valores com o *dwell time* original de 50 ms (dados apresentados na **Tabela 15**). O *dwell time* é o tempo gasto pelo instrumento para adquirir cada transição de MRM durante cada ciclo, sendo que um maior *dwell time* aumenta a quantidade de sinal acumulado, podendo consequentemente melhorar a sensibilidade (SHIMADZU, 2011). Entretanto, um *dwell time* muito alto pode comprometer a precisão e exatidão do método. Dessa forma, o ajuste deve ser suficiente para aumentar a sensibilidade até o ponto em que não comprometa o perfil do pico.

Tabela 15 - Comparação das médias das áreas e desvios padrão relativos (%RSD) dos analitos (1ª transição) quando utilizado o método com *dwell time* de 50 ms e o método com *dwell time* de 100 ms

Analito	<i>dwell time</i> de 50 ms		<i>dwell time</i> de 100 ms	
	Média da área	%RSD	Média da área	%RSD
ERI	334000,00	0,518	349000,00	1,25
ESP	47666,67	2,01	51033,33	3,17
OLE	270666,67	7,26	277666,67	6,81
TIL	295666,67	4,50	304333,33	5,22
TILM	29733,33	2,61	28233,33	5,36

Fonte: (Da autora, 2019).

A redução do tempo de reequilíbrio de 10 min para 5 min não impactou negativamente o RSD% das áreas e dos tempos de retenção (t_R), exceto para ROX onde se observou um aumento do RSD para a área. Entretanto, A ROX foi usada como padrão interno somente para fins qualitativos (**Tabela 16**). Esses resultados viabilizaram os ajustes finos que foram adotados no método final.

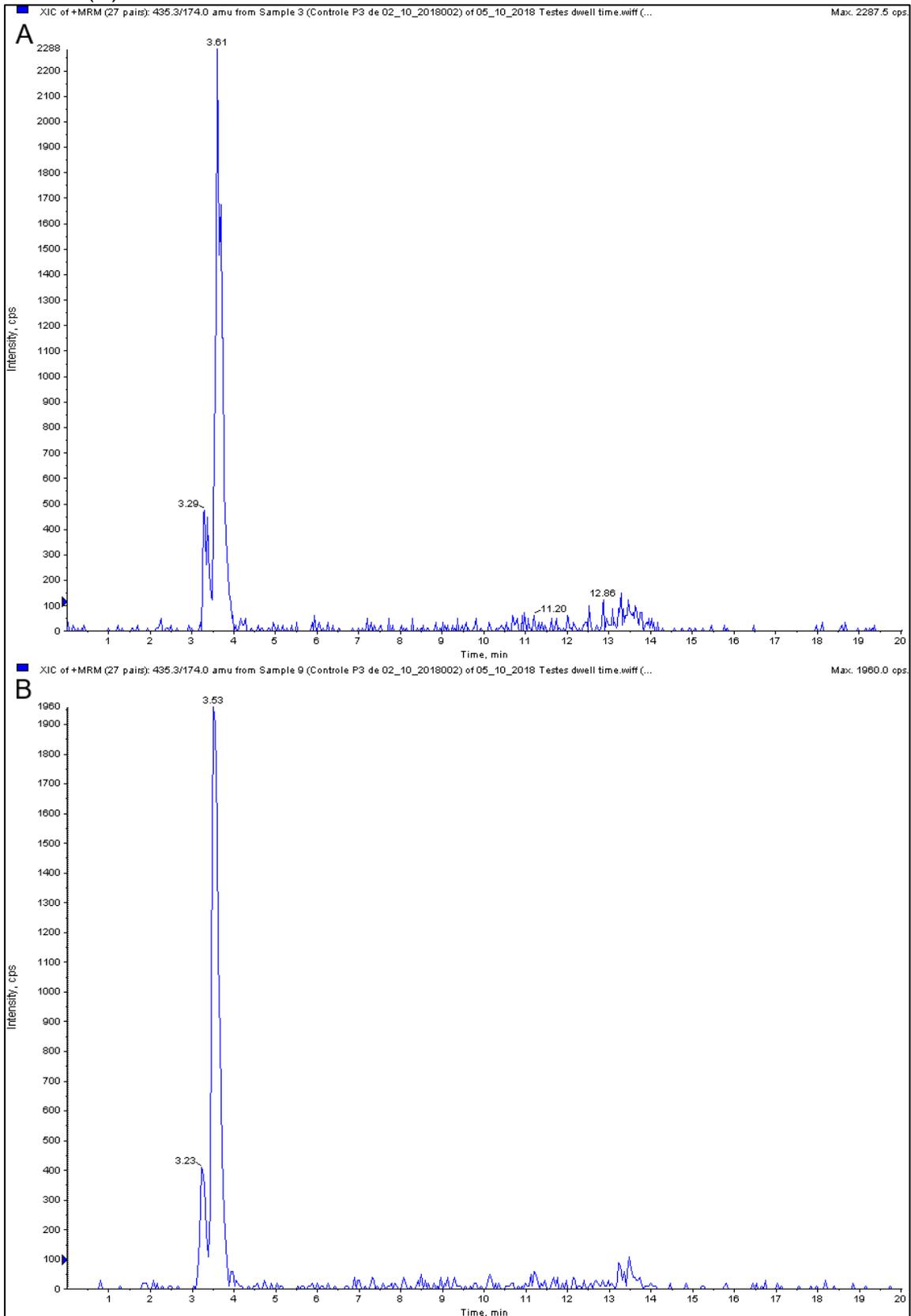
Tabela 16 - Comparação entre os resultados obtidos para os analitos (áreas da 1ª transição) com a análise utilizando método analítico com tempo de corrida de 20 min e com o método analítico com tempo de corrida de 15 min

Analito	Tempo total de corrida	RSD % de área	RSD % t _R
ERI	20 min	3,99	0,000986
	15 min	1,84	0,00299
ESP	20 min	6,61	0,00265
	15 min	6,77	0,00273
OLE	20 min	7,66	0,00259
	15 min	0,86	0,00228
TIL	20 min	3,94	0
	15 min	4,66	0,000827
TILM	20 min	2,55	0
	15 min	3,35	0,00163
ROX	20 min	6,90	0,00116
	15 min	11,5	0,000673

Fonte: (Da autora, 2019).

A **Figura 9** apresenta como exemplo o cromatograma de íon extraído do analito TILM (m/z 435,34/174,0) utilizando o método analítico com *dwell time* de 50 ms e tempo de corrida de 20 min e utilizando o método com *dwell time* de 100 ms e tempo de corrida de 15 min.

Figura 9 - Cromatograma do analito TILM utilizando o método com *dwell time* de 50 ms e tempo de corrida de 20 min (A) e *dwell time* de 100 ms e tempo de corrida de 15 min (B)

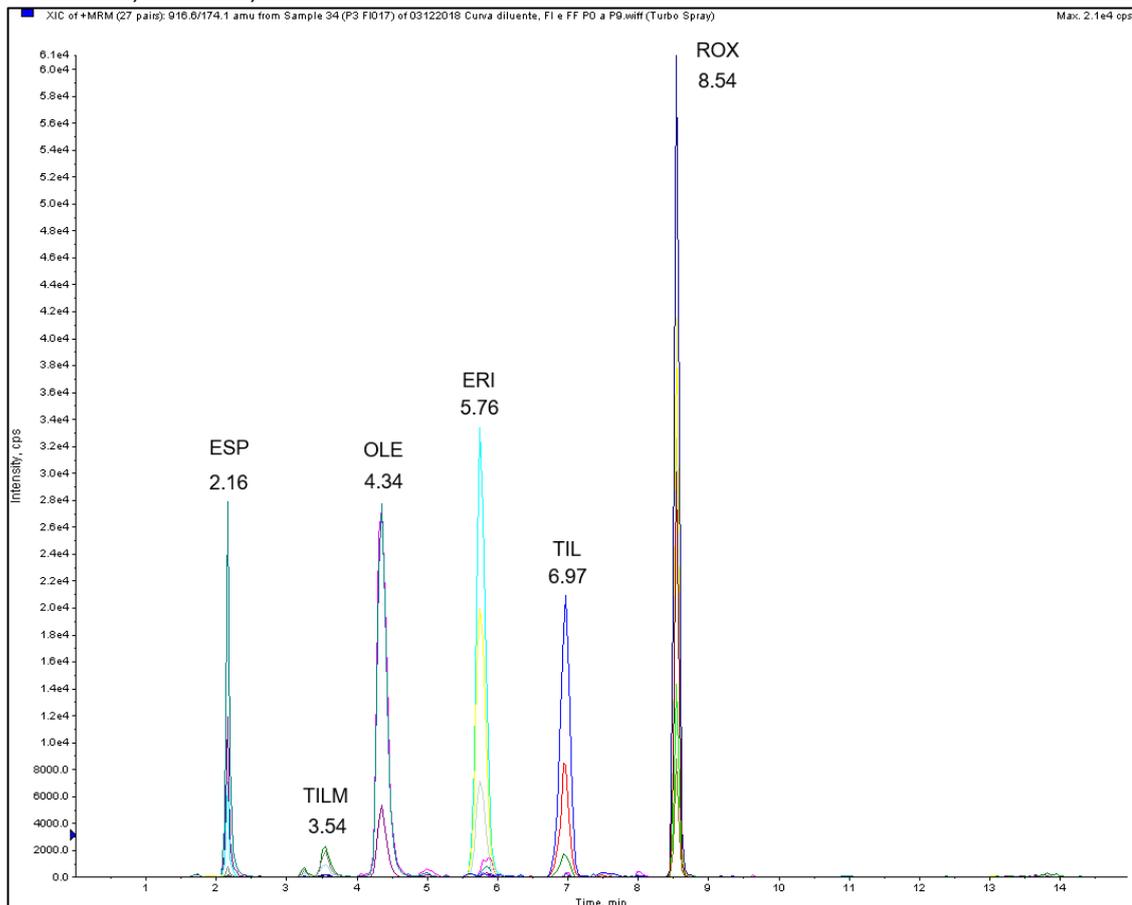


Fonte: (Da autora, 2019).

Como descrito por Costa (2014) durante o estudo de desenvolvimento do método, a infusão de todos os analitos com ionização positiva, no modo de aquisição de varredura total, gerou moléculas monoprotionadas $[M+H]^+$ para ERI, OLE e TIL e duplamente protonadas $[M+H]^+$ e $[M+2H]^{2+}$ para ESP, ROX e TILM. As moléculas duplamente protonadas foram as mais intensas para ESP, TILM e ROX e, portanto selecionadas como íons de quantificação.

A **Figura 10** apresenta o cromatograma de íons totais obtidos para uma amostra de fórmula infantil fortificada no início, antes do procedimento de extração, no nível de concentração equivalente a 10 ng/mL.

Figura 10 - Cromatograma de íons totais obtido para uma amostra de fórmula infantil fortificada no início do procedimento a 10 ng/mL para espiramicina, oleandomicina, eritromicina, tilosina, tilmicosina e roxitromicina

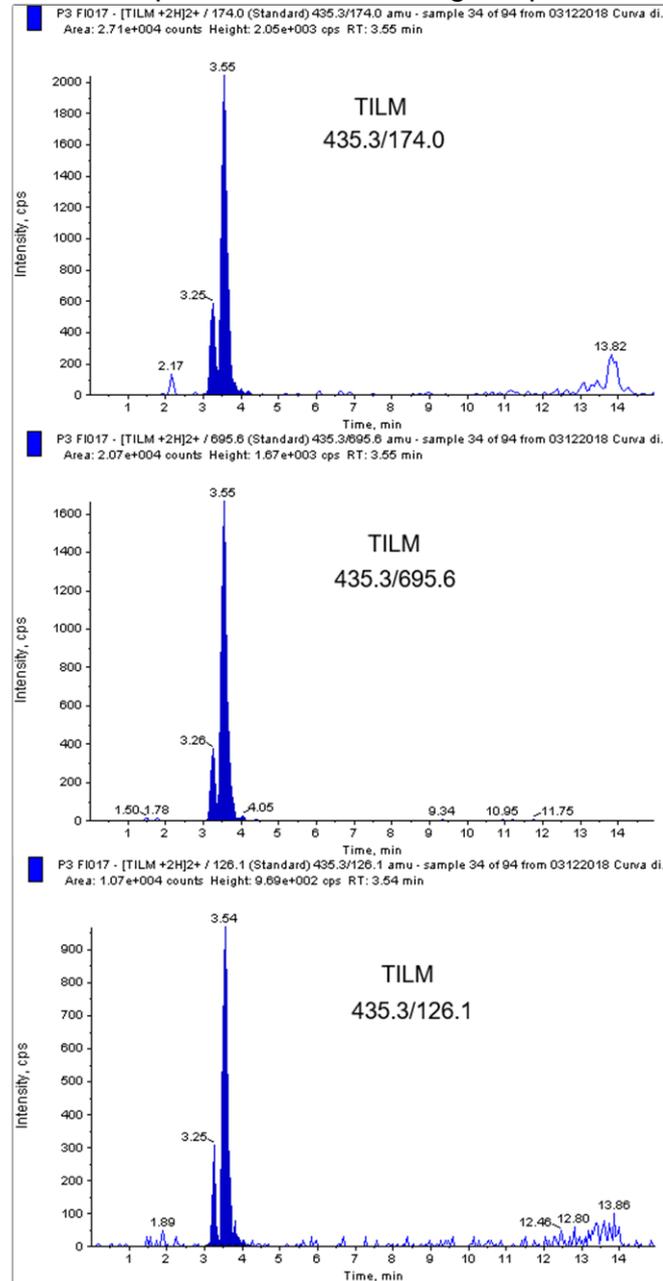


Fonte: (Da autora, 2019).

Para a tilmicosina observou-se dois picos parcialmente separados em todas as transições monitoradas, tanto às referentes às moléculas monoprotionadas quanto as referentes às moléculas duplamente protonadas. A tilmicosina possui uma concentração de isômeros trans e cis que variam de 12 a 18% e 82 a 88%,

respectivamente (Stoev, Nazarov, 2008). O cálculo das áreas se deu pela soma dos seus isômeros como mostra a **Figura 11**.

Figura 11 - Cromatograma de íon extraído obtido para uma amostra de fórmula infantil fortificada no início do procedimento a 10 ng/mL para tilmicosina.



Fonte: (Da autora, 2019).

4.3 Validação do método analítico para fórmulas infantis tipos 1 e 2

Uma vez que não há LMRs ou tolerâncias estabelecidas para macrolídeos em fórmulas infantis, um método analítico qualitativo já seria suficiente para indicar a

conformidade ou não de uma amostra. Entretanto, a fim de possibilitar a estimativa de exposição de lactentes aos 5 antimicrobianos pesquisados pela ingestão das fórmulas infantis, o método foi validado e avaliado quanto aos critérios de desempenho para atender também aos parâmetros de um método quantitativo.

4.3.1 Seletividade (incluindo efeito matriz relativo)

Das 20 amostras de fórmulas infantis analisadas no estudo de seletividade, apenas 5 amostras se mostraram livres de picos na região de eluição dos analitos pesquisados. Em 14 amostras foi observada a presença de picos com relação sinal/ruído ≥ 3 nas 2 transições mais intensas na região do t_R da ESP, em 2 amostras na região do t_R da TILM, assim como em 2 amostras no t_R da TIL. Em algumas amostras foram observados picos no t_R destes três analitos, porém não atenderam os critérios de relação sinal/ruído ≥ 3 na 1ª e 2ª transições. A presença de picos nas zonas que se preveem a eluição dos analitos sugere que realmente o analito esteja presente, porém para a confirmação é necessário, além da avaliação de sinal/ruído, o cálculo da razão de íons (1ª e 2ª transição) e a verificação do tempo de retenção relativo ao padrão interno (BRASIL, 2011e; UNIÃO EUROPEIA, 2002). Esses dados vão ao encontro dos resultados obtidos por Costa (2014) na matriz leite, onde foi verificada a presença de macrolídeos em 26 amostras de leite, das 41 adquiridas (ESP em 21 amostras e TIL em 5 amostras). O software ResVal (v.3) também é capaz de avaliar o parâmetro da seletividade do método. Os resultados para os dados gerados na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária lançados no software classificaram o método como seletivo a partir da utilização de seis amostras distintas.

Interferentes podem com frequência estar presentes, mas não serem detectados pela técnica de espectrometria de massas sequencial. Isso se deve à alta seletividade da aquisição no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) (INCQS, 2015b). A fim de verificar se diferentes interferentes não detectáveis poderiam influenciar na resposta do detector e conseqüentemente na quantificação dos analitos, as curvas de calibração obtidas com as 6 diferentes fontes de matriz foram avaliadas através do cálculo do desvio padrão relativo (RSD) dos coeficientes angulares das curvas de cada analito. Também foram avaliadas as curvas de calibração dos analitos no diluente com a finalidade de observar o efeito matriz.

Utilizando-se o método dos mínimos quadrados ponderados com peso $1/y$, uma vez que os dados se mostraram heterocedásticos, a equação do modelo que melhor se ajustou aos pontos da curva foi calculada para cada uma das 6 amostras de fórmulas infantis e solução padrão e os coeficientes angulares das funções de calibração foram comparados entre as amostras e entre as amostras e a solução padrão. Os valores de RSD estão dispostos na **Tabela 17**.

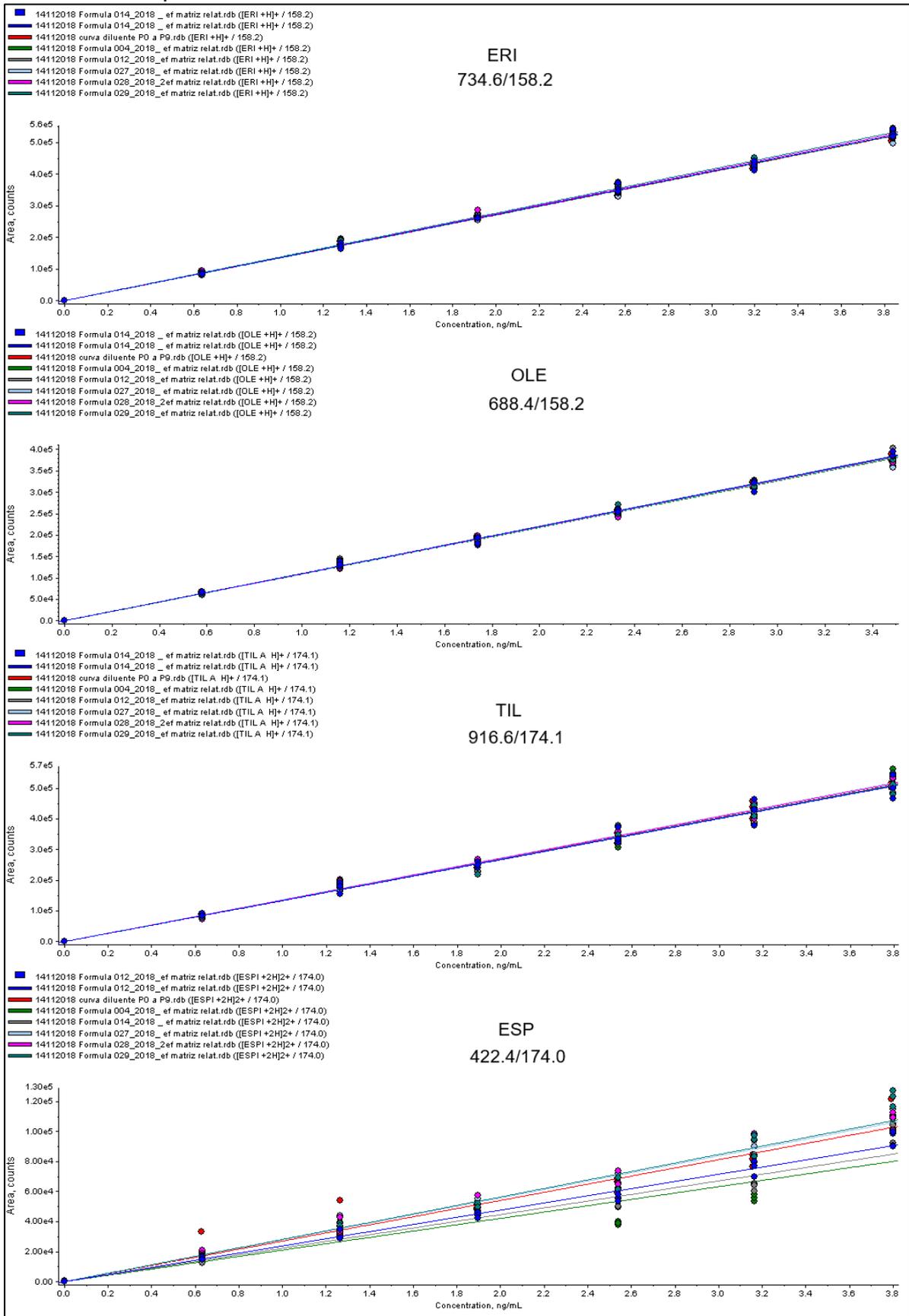
Tabela 17 - RSDs obtidos entre os coeficientes angulares de curvas de calibração na matriz e em solução padrão para avaliação de efeito matriz relativo

Analitos	RSD (comparação entre as amostras)	RSD (Comparação entre as amostras e a solução padrão)
ERI	0,89	0,83
ESP	10,07	10,86
OLE	0,47	0,44
TIL	1,02	0,95

Fonte: (Da autora, 2019).

O RSD dos coeficientes angulares de até 15% na comparação entre os coeficientes angulares das amostras indicou que não foi possível afirmar que as variadas matrizes avaliadas não responderam de forma semelhante devido a interferentes diferenciados da matriz e que, por conseguinte, o tipo de amostra não interferiu de forma significativa na quantificação do analito. Isso demonstrou que o método pode ser utilizado para fórmulas infantis tanto do tipo 1 quanto do tipo 2. Ao se incluir na comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração nas amostras o coeficiente angular da curva de calibração da solução padrão, não se observaram diferenças significativas entre amostras e solução padrão, indicando que os constituintes da amostra não alteraram a resposta instrumental quando comparados à solução padrão. O RSD da TILM não foi calculado, uma vez que a eliminação de vários níveis de concentração nas curvas de calibração de duas das seis amostras limitou a avaliação (INCQS, 2015b). Esse comportamento anômalo em relação à linearidade da resposta da TILM foi observado ao longo de todo o processo da validação, o que culminou na classificação do método para o analito TILM como método qualitativo e não quantitativo. A **Figura 12** demonstra a sobreposição das curvas para os analitos ERI, ESP, OLE e TIL nas diferentes matrizes.

Figura 12 - Curvas dos analitos ERI, ESP, OLE e TIL no diluente e nas 6 diferentes matrizes sobrepostas



Fonte: (Da autora, 2019).

O método demonstrou ser seletivo para os analitos estudados, entretanto para a TILM observou-se interferência da matriz na resposta do analito.

4.3.2 Intervalo de medição e intervalo linear instrumental

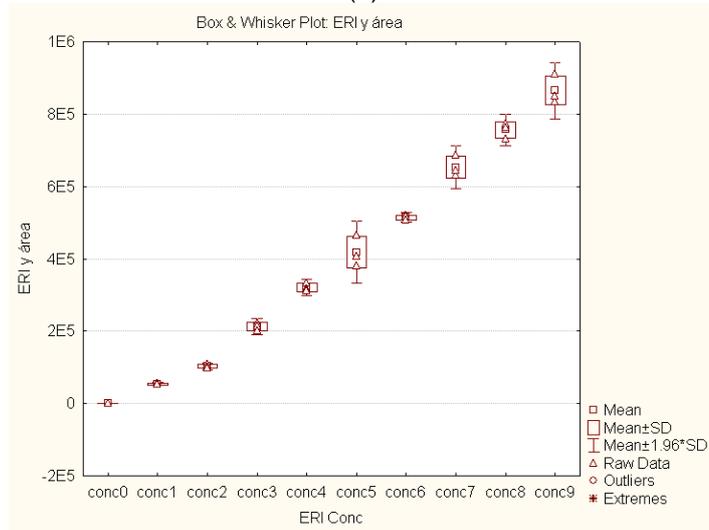
A razão sinal/ruído dos picos dos cromatogramas referentes ao nível de 0,3125 ng/mL (P1) das 3 curvas de calibração no diluente foi avaliada nas transições de quantificação (1ª transição) e de confirmação (2ª transição). Para os analitos ESP, ERI, OLE e TIL todos os picos apresentaram razão sinal/ruído ≥ 10 para a transição de confirmação usada e a de quantificação na concentração mais baixa da curva. Sendo assim, o limite inferior do intervalo de medição instrumental para esses analitos foi definido como a menor concentração utilizada na curva de calibração, ou seja, 0,25 vezes a concentração alvo, equivalente a 0,3125 ng/mL (INCQS, 2015b). Para a TILM, o menor nível avaliado não apresentou razão sinal/ruído ≥ 10 para as duas transições nas três curvas e conseqüentemente o limite inferior do intervalo foi definido pela concentração superior, de 0,5 vezes a concentração alvo que forneceu razão sinal/ruído ≥ 10 , equivalente a 0,625 ng/mL.

A verificação da presença de valores aberrantes no conjunto de dados realizada pelo teste de *Grubbs* a $\alpha = 0,01$ para todos os analitos em cada nível de concentração não indicou nenhum valor aberrante. O nível P8 da TILM foi excluído em uma das curvas, pois não apresentou resposta proporcional à concentração do analito na amostra, se mostrando muito discrepante em relação aos demais pontos da curva.

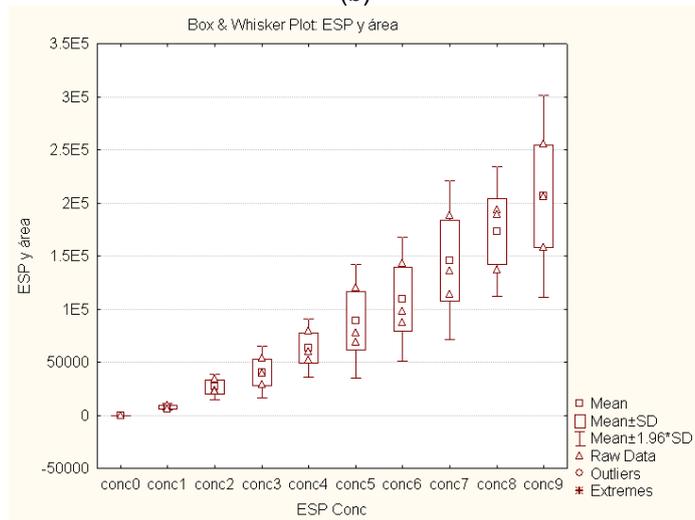
Os dados de todos os analitos apresentaram heterocedasticidade avaliada pelo teste de Levene ($p \leq 0,05$), indicando que a hipótese nula de que as variâncias eram homogêneas foi rejeitada e o método dos mínimos quadrados ordinários não deveria ser empregado. O diagrama de Box-Whisker ilustra a variabilidade dos resultados (**Figura 13**).

Figura 13 - Diagrama de Box-Whisker das curvas no diluente no primeiro dia de experimento para ERI (a), ESP (b), OLE (c), TIL (d) e TILM (e) (continua)

(a)



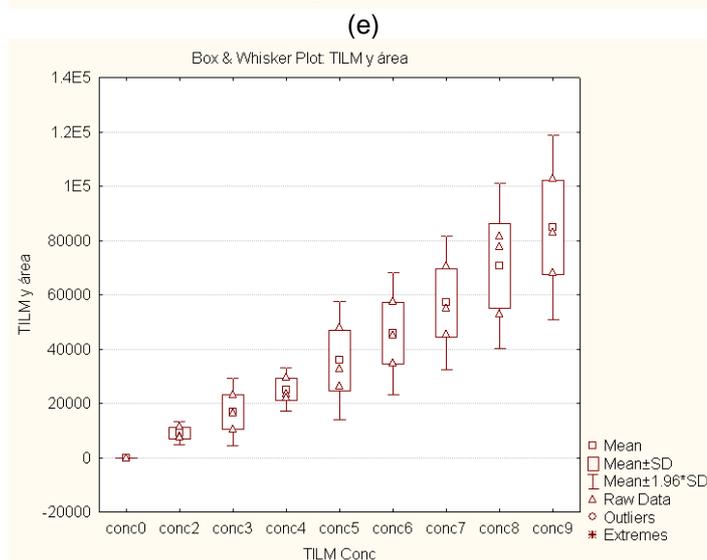
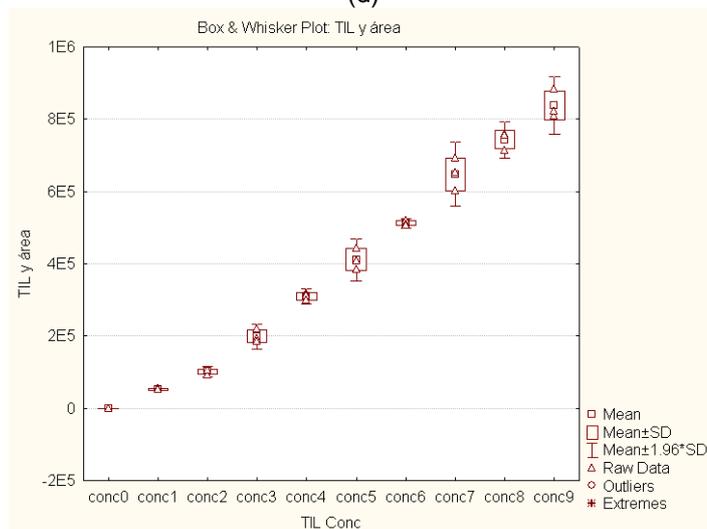
(b)



(c)



Figura 13 - Diagrama de Box-Whisker das curvas no diluente no primeiro dia de experimento para ERI (a), ESP (b), OLE (c), TIL (d) e TILM (e) (conclusão)



Fonte: (Da autora, 2019).

Sendo assim, as curvas de calibração foram construídas para todos os analitos utilizando o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP), com peso equivalente a $1/y$, onde y equivale à área. A **Tabela 18** apresenta os dados das curvas de calibração para os cinco analitos pesquisados.

Tabela 18 - Resultados para o intervalo linear instrumental considerando os três dias de experimento (continua)

Analito	Intervalo linear (ng/mL)	$r \pm SD$	p-valor $\pm SD$
ERI	0,3125 - 5,0	$0,999 \pm 0,001$	$2,2 \times 10^{-31} \pm 3,08 \times 10^{-31}$
ESP	0,3125 - 5,0	$0,952 \pm 0,02$	$8,05 \times 10^{-13} \pm 1,39 \times 10^{-12}$
OLE	0,3125 - 5,0	$0,999 \pm 0,001$	$1,07 \times 10^{-30} \pm 1,05 \times 10^{-30}$

Tabela 18 - Resultados para o intervalo linear instrumental considerando os três dias de experimento (conclusão)

Analito	Intervalo linear (ng/mL)	r ± SD	p-valor ± SD
TIL	0,3125 - 5,0	0,998 ± 0	$4,39 \times 10^{-31} \pm 1,3 \times 10^{-31}$
TILM	0,625 - 5,0	0,942 ± 0,02	$4 \times 10^{-11} \pm 5,29 \times 10^{-11}$

Fonte: (Da autora, 2019).

A comparação entre o modelo de regressão linear (de primeira ordem) e um modelo de regressão quadrática, polinomial de segunda ordem, foi realizada para conferir o ajuste do modelo matemático. Quando o valor de p é $\leq 0,05$ para o parâmetro de segunda ordem, conclui-se que a adição deste parâmetro melhora significativamente o ajuste do modelo e que o modelo polinomial de segunda ordem fornece um ajuste mais adequado ao conjunto de dados, indicando desvio da linearidade do modelo linear de primeira ordem (INCQS, 2015a). Todos os analitos apresentaram valores de p estatisticamente mais significativos para o ajuste através do modelo de primeira ordem (**Tabela 19**).

Tabela 19 - Valores de p considerando regressão linear de primeira ordem e valores de p considerando modelo polinomial de segunda ordem para os três dias de experimentos

Analito	Dia de experimento	Valor de p (parâmetro de primeira ordem)	Valor de p (parâmetro de segunda ordem)
ERI	1º	0	0,250
	2º	$1,11 \times 10^{-16}$	0,771
	3º	0	0,157
ESP	1º	0,000530	0,212
	2º	0,000172	0,585
	3º	0,0266	0,161
OLE	1º	0	0,107
	2º	$2,22 \times 10^{-16}$	0,699
	3º	0	0,584
TIL	1º	$1,11 \times 10^{-16}$	0,251
	2º	$1,11 \times 10^{-16}$	0,960
	3º	$1,11 \times 10^{-16}$	0,835
TILM	1º	0,0747	0,0959
	2º	0,0183	0,847
	3º	0,0158	0,293

Fonte: (Da autora, 2019).

O intervalo linear do equipamento LC-MS/MS demonstrou ser o intervalo que incluiu as concentrações de 0,3125 a 5,0 ng/ mL para os analitos ERI, ESP, OLE e TIL, concentrações equivalentes à 0,25 a 4,0 vezes a concentração alvo na amostra quando fortificada no início, enquanto que para a TILM o intervalo ficou entre 0,625 a 5,0 ng/ mL, concentrações equivalentes à 0,5 a 4,0 vezes a concentração alvo na amostra.

4.3.3 Linearidade (intervalo linear do método), sensibilidade e efeito matriz absoluto

4.3.3.1 Linearidade (intervalo linear do método) e sensibilidade

Preliminarmente, os cromatogramas das curvas no diluente foram verificados na menor concentração estudada (0,25 vezes a concentração alvo) com a finalidade de verificar a relação sinal/ruído nas transições de quantificação (1ª transição) e na transição de confirmação mais intensa (2ª transição). Para todos os analitos os picos apresentaram relação sinal/ruído ≥ 10 para ambas as transições, sendo assim o limite inferior do intervalo de medição pode ser considerado a menor concentração estudada (INCQS, 2015b). Para a curva no diluente da TILM foi necessária a retirada das concentrações nos níveis de P6 e P7 devido a erros grosseiros. Foi identificado apenas um resultado aberrante (1 injeção), pelo teste de *Grubbs* a $\alpha = 0,01$ para os analitos TIL e ERI na curva de calibração com fortificação no início do procedimento. Para o analito TILM foi necessária a retirada da concentração no nível de P6 da curva com fortificação no início do procedimento pois não apresentou resposta proporcional à concentração do analito na amostra, se mostrando muito discrepante em relação aos demais pontos da curva.

O teste de Levene indicou heterogeneidade das variâncias para todos os analitos presentes na matriz fortificada no início, e portanto, a verificação da falta de ajuste foi efetuada pela comparação entre o modelo linear de primeira ordem (MMQP) e o modelo polinomial de segunda ordem. Para todos os analitos o valor de p de primeira ordem foi mais significativo e não foi identificado desvio da linearidade do modelo de primeira ordem (MMQP). Através da planilha *Parameter Estimates* (conforme exemplo da **Figura 14**), pode-se avaliar o ajuste do modelo através do valor de p gerado.

Figura 14 - Valor de p gerado pela planilha *Parameter Estimates* do software *Statistica*® 8.0 para avaliação do melhor ajuste do modelo para o analito ERI

Effect	Parameter Estimates (ERI_curva FI PO a P9.03_12_18) Sigma-restricted parameterization					
	ERI y área Param.	ERI y área Std.Err	ERI y área t	ERI y área p	-95.00% Cnf.Lmt	+95.00% Cnf.Lmt
Intercept	-12669.7	7435.629	-1.70392	0.101872	28051.5	2712.07
ERI x ng/mL	32877.6	1411.691	23.28950	0.000000	29957.3	35797.88
ERI x ng/mL^2	32.7	39.584	0.82651	0.417004	-49.2	114.60

Fonte: (Da autora, 2019).

Como o valor de p do parâmetro de 1ª ordem, concentração (ng/mL), foi $\leq 0,05$ (na quarta coluna da planilha), o parâmetro se mostrou estatisticamente significativo. Como o valor de p do parâmetro de 2ª ordem, concentração (ng/mL)², foi $\geq 0,05$ (na quarta coluna), a adição deste parâmetro não melhorou o ajuste do modelo e concluiu-se que o modelo linear forneceu um ajuste mais adequado ao conjunto de dados.

A regressão pelo MMQP indicou ser adequada e o intervalo linear do detector na presença de matriz foi de 0,25 a 4,0 vezes a concentração alvo (2,5 a 40 ng/mL) para todos os analitos.

A **Tabela 20** apresenta os resultados de linearidade para cada analito na matriz fórmula infantil. Pode-se observar que todos os valores de R^2 foram superiores a 0,990, exceto para TILM que apresentou o valor de 0,985. Tanto R^2 quanto r são muitas vezes empregados como sinônimo de linearidade. O coeficiente de correlação r é uma medida que relaciona x e y. É muito usado para avaliação de linearidade e quando não há correlação linear entre x e y o valor de r permanece próximo de zero ($-1 \leq r \leq +1$) (MILLER; MILLER, 2010). Porém, é importante salientar que se os pontos de calibração estiverem bem agrupados em torno de uma linha reta o valor experimental será próximo de 1, mas o inverso não é verdadeiro. Um valor de r próximo de 1 não é necessariamente indicativo de linearidade, pode ser um resultado de pontos em torno de uma curva. Portanto, somente valores de r não devem ser comparados para avaliar a linearidade. Uma calibração com $r = 0,999$ necessariamente se aproxima de uma linha reta, porém não podemos afirmar o quão próximo da reta ela está. A avaliação dos resíduos da regressão linear pode confirmar esta avaliação. Os resíduos são as distâncias dos pontos experimentais em relação à linha de regressão ajustada e quando não há falta de ajuste (calibração linear) os resíduos plotados de forma aleatória contra a concentração apresentarão uma distribuição normal com média zero (THOMPSON, 2005). O

método de análise de variância ANOVA gera valores de R^2 (coeficiente de determinação) e este valor se aproxima de 1 quando há melhora do ajuste da curva (MILLER; MILLER, 2010).

Quanto à sensibilidade, parâmetro de validação dado pelo coeficiente angular b_0 das curvas de calibração descritas como $y = b_0 + b_1x$ obtidas com a matriz fortificada no início, pode-se concluir que a sensibilidade foi maior para a ERI e OLE.

Tabela 20 - Dados das curvas de calibração com fortificação no início do procedimento na matriz representativa 012/2018

Analito	Intervalo linear (ng/mL)	Equação da reta	R	R^2	p-valor
ERI	2,5 - 40	$y = 33100 x + 2,71$	0,998	0,997	$1,72 \times 10^{-31}$
ESP	2,5 - 40	$y = 13700 x + 5,13$	0,996	0,991	$3,48 \times 10^{-27}$
OLE	2,5 - 40	$y = 32700 x + 2,74$	0,999	0,997	$4,42 \times 10^{-33}$
TIL	2,5 - 40	$y = 22400 x + 1,94$	0,996	0,992	$1,65 \times 10^{-21}$
TILM	2,5 - 40	$y = 3440 x + 2,68$	0,992	0,985	$1,38 \times 10^{-21}$

Fonte: (Da autora, 2019).

4.3.3.2 Efeito matriz absoluto

Os dados experimentais das curvas de calibração na matriz fortificada no final do procedimento de extração foram checados para verificar a existência de valores aberrantes pelo teste de *Grubbs* a $\alpha = 0,01$ para todos os analitos em cada nível de concentração e foi identificado apenas um resultado aberrante (1 injeção) para os analitos TILM e ERI. Para o analito OLE foi necessária a retirada de dois valores aberrantes (1 injeção no nível de P8 e 1 injeção no nível de P9) da curva fortificada no final do procedimento de extração.

O teste de Levene realizado pelo software *Statistica*® 8.0 indicou heterogeneidade das variâncias para todos os analitos presentes na matriz fortificada no final, e portanto, a verificação da falta de ajuste foi efetuada pela comparação entre o modelo linear empregado de primeira ordem (MMQP) e o modelo polinomial de segunda ordem. Para todos os analitos o valor de p de primeira ordem foi mais significativo e não foi identificado desvio da linearidade do modelo de primeira ordem (MMQP).

O efeito matriz absoluto, verificado pela comparação dos coeficientes angulares da curva de calibração no diluente com a curva de calibração na matriz fortificada no final do procedimento, por meio do cálculo do teste *t* (*Student*).

Anteriormente ao teste t (*Student*), as variâncias residuais das curvas foram avaliadas pelo teste F para verificar se eram significativamente diferentes.

A comparação entre os coeficientes angulares, pelo teste t indicou que para os analitos ERI, ESP, TIL e TILM as curvas de calibração no diluente e calibração na matriz fortificada no final não foram estatisticamente diferentes a $\alpha = 0,05$ (não há efeito de matriz), enquanto que para o analito OLE as curvas são estatisticamente diferentes, evidenciando efeito matriz absoluto.

Dessa forma, a curva de calibração deve ser efetuada na matriz para o analito OLE, para compensar esse efeito. Entretanto, considerando que o método é multiresíduo, todas as curvas foram feitas na matriz para compensar o efeito matriz e corrigir automaticamente a recuperação.

4.3.4 Recuperação, repetibilidade, precisão intermediária, $CC\alpha$, $CC\beta$, incerteza de medição, LOQ e LOD

Após a exclusão de valores aberrantes pelo teste de Grubbs a $\alpha = 0,01$, a planilha do software ResVal foi alimentada com os dados de concentração resultantes das análises das 6 amostras fortificadas no início, anteriormente à etapa de extração, em 3 concentrações, 5 ng/mL, 10 ng/mL e 15 ng/mL (1, 2 e 3 vezes a concentração alvo) e mais os valores dos brancos.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), como não são calculados pelo ResVal, foram estimados por meio de extrapolação, considerando a relação sinal/ruído ≥ 3 e ≥ 10 , respectivamente, dos sinais instrumentais nas transições de confirmação para atender aos critérios de identificação/confirmação preconizados (UNIÃO EUROPEIA, 2002). Os valores foram obtidos a partir dos dados das 18 amostras resultantes da precisão intermediária no menor nível de fortificação estudado (5 ng/mL). Os valores de LOD e LOQ foram estimados de uma forma mais conservadora e equivalem aos maiores valores obtidos entre as médias de LOD e LOQ calculados, respectivamente, nos diferentes dias. Os resultados dos cálculos de recuperação, repetibilidade, precisão intermediária, $CC\alpha$, $CC\beta$, incerteza de medição, LOQ e LOD do estão descritos na **Tabela 21**.

Tabela 21 - Resultados da recuperação, repetibilidade, precisão intermediária, $CC\alpha$, $CC\beta$, incerteza, LOD e LOQ, n = 18, exceto os valores identificados com (b) sobrescrito

Analito	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	$CC\alpha$ (ng/mL)	$CC\beta$ (ng/mL)	Nível de fortificação (ng/mL)	Recuperação (%)	Repetibilidade (RSD, %)	Precisão intermediária (RSD, %)	Incerteza expandida (ng/mL)	Incerteza expandida (%)
ERI	0,04	0,15	0,82	1,64	5	100	3,5	4,2	0,417	8,3
					10	99,6	2,3	3,7	0,743	7,4
					15	103 ^(b)	1,7 ^(b)	3,9 ^(b)	1,19	8,0
ESP	0,11	0,36	4,38	8,76	5	104 ^(b)	10,9 ^(b)	12,6 ^(b)	1,31	26,1
					10	107	5,3	6,8	1,44	14,4
					15	117	12,1	12,8	4,50	30,0
OLE	0,10	0,34	0,99	1,97	5	90,4 ^(b)	2,7 ^(b)	2,7 ^(b)	0,247	4,9
					10	90,7	2,3	2,7	0,490	4,9
					15	94,7 ^(b)	2,0 ^(b)	2,7 ^(b)	0,763	5,1
TIL	0,37	1,22	2,57	5,13	5	97,7	3,6	4,0	0,395	7,9
					10	98,8	3,0	3,9	0,763	7,6
					15	101	6,0	6,2	1,88	12,5
TILM	0,37	--	4,5 ^(a)	7,8 ^(a)	5	139 ^(b)	25,4 ^(b)	29,3 ^(b)	4,06	81,3
					10	137	20,9	24,8	6,79	67,9
					15	176	54,1	58,3	30,9	206

^(a) Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ adotados para a TILM não foram calculados pelo ResVal e sim conforme manual do MAPA (BRASIL, 2011e).

^(b) 17 replicatas verdadeiras.

Fonte: (Da autora, 2019).

Para avaliar os resultados da repetibilidade, obtidos por análises efetuadas em condições de repetibilidade, os RSD_r globais devem estar abaixo dos valores listados na **Tabela 22**. Estes valores equivalem a aproximadamente 2/3 dos desvios padrão relativos de reprodutibilidade (RSD_R) para cada nível de concentração.

Tabela 22 - Exemplos de desvio padrão relativo em condições de repetibilidade (RSD_r) para métodos quantitativos referentes a um intervalo de concentrações da substância a analisar

Concentração	RSD_r
<1µg/kg	36%
≥1µg/kg <10µg/kg	32%
≥10µg/kg <100µg/kg	22%
≥100µg/kg <1000µg/kg	18%
≥1000µg/kg	14%

Fonte: (CAC, 2014).

Segundo as orientações da União Europeia (2002), os valores RSD_r devem ser os mais baixos possíveis para valores de concentrações abaixo de 100 µg/kg, uma vez que o cálculo pela equação de Horwitz ($CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$, onde C = é a fração de massa expressa como exponencial de 10) fornece valores considerados elevados. Para os níveis de 5, 10 e 15 µg/kg, os valores calculados são de 24, 21 e 20%, respectivamente, pela equação de Horwitz.

De acordo com os resultados calculados pelo ResVal para repetibilidade, todos os analitos atenderam aos valores da **Tabela 22**, exceto a TILM na concentração de 15 ng/mL. Para os demais analitos o RSD_r não excedeu 13%.

Para avaliar os resultados da precisão intermediária, obtidos por análises efetuadas em condições de precisão intermediária, os valores de RSD intralaboratorial global devem estar abaixo dos valores dos desvios padrão relativos de reprodutibilidade (RSD_R) para cada nível de concentração, como listados na **Tabela 23**.

Tabela 23 - Exemplos de desvio padrão relativo em condições de reprodutibilidade (RSD_R) para métodos quantitativos referentes a um intervalo de concentrações da substância a analisar

Concentração	RSD_R
<1 μ g/kg	54%
\geq 1 μ g/kg <10 μ g/kg	46%
\geq 10 μ g/kg <100 μ g/kg	34%
\geq 100 μ g/kg <1000 μ g/kg	25%
\geq 1000 μ g/kg	19%

Fonte: (CAC, 2014).

Segundo as orientações da União Europeia (2002), os valores RSD_R devem ser os mais baixos possíveis para valores de concentrações abaixo de 100 μ g/kg, uma vez que os cálculos pela equação de Horwitz fornecem valores considerados excessivamente elevados. Para os níveis de 5, 10 e 15 μ g/kg, a equação de Horwitz fornece os valores de 36, 32 e 30%, respectivamente.

De acordo com resultados calculados para precisão intermediária, todos os analitos atenderam aos valores da **Tabela 23**, exceto a TILM na concentração de 15 ng/mL. Para os demais analitos o RSD_R não excedeu 13%

Segundo o *Codex Alimentarius* e a União Europeia, os resultados de veracidade mínima, expressa como tendência ou recuperação, devem atender às faixas estabelecidas descritas nas **Tabelas 24 e 25**.

Tabela 24 - Veracidade mínima (expressa como tendência ou recuperação) dos métodos quantitativos segundo a União Europeia

Concentração	Intervalo
\leq 1 μ g/kg	-50% a +20%
>1 μ g/kg \leq 10 μ g/kg	-30% a +10%
>10 μ g/kg	-20% a +10%

Fonte: (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

Tabela 25 - Veracidade mínima (expressa como tendência ou recuperação) dos métodos quantitativos segundo o *Codex Alimentarius*

Concentração	Intervalo
< 1 μ g/kg	-50% a +20%
\geq 1 μ g/kg < 10 μ g/kg	-40% a +20%
\geq 10 μ g/kg < 100 μ g/kg	-30% a +20%
\geq 100 μ g/kg < 1000 μ g/kg	-30% a +10%
\geq 1000 μ g/kg	-30% a +10%

Fonte: (CAC, 2014).

Comparando os resultados gerados pelo ResVal com os intervalos aceitáveis descritos, os analitos TIL, ERI e OLE atenderam aos valores de recuperação mínima de acordo com as orientações do *Codex* e da União Europeia. A ESP ficou um pouco acima do intervalo da União Europeia na concentração de 15 µg/kg, porém atendeu ao intervalo definido pelo *Codex*. Entretanto, os valores da TILM se mostraram bem acima do limite superior do intervalo estabelecido tanto pelo *Codex* quanto pela União Europeia. Para os analitos TIL, ERI, OLE e ESP a recuperação variou de 90% (OLE) a 117% (ESP).

Os valores de CC α e de CC β são calculados pelo ResVal de acordo com a ISO 11843 – 2:2000 revisada em 2007 que se baseia no uso da curva de calibração para a definição dos valores críticos (BS, 2008). O maior valor de CC α e CC β , calculados separadamente para cada um dos 3 dias de experimentos, é o valor considerado pelo software.

Para TILM, os valores gerados pelo ResVal de repetibilidade, precisão intermediária e veracidade não atenderam aos critérios estabelecidos pelos guias de orientação. Sendo assim, para TILM, o método pode ser utilizado apenas como método qualitativo de confirmação. Por esse motivo adotou-se uma abordagem diferenciada para calcular CC α e CC β para esse analito. Os cálculos foram baseados no manual do MAPA (BRASIL, 2011e) a partir do resultado de 20 matrizes brancas fortificadas na concentração alvo, de acordo com as **equações 7 e 8**.

$$CC\alpha = 2,33 \times s \quad (7)$$

$$CC\beta = 3,97 \times s \quad (8)$$

Onde:

s = Desvio-padrão amostral das concentrações do analito nessa série de 20 resultados de amostras fortificadas no nível da concentração alvo (5 ng/mL) em condições de precisão intermediária.

Os resultados destes cálculos geraram um novo valor de CC α = 4,5 ng/mL e CC β = 7,8 ng/mL para TILM.

O cálculo da incerteza combinada através do software ResVal (v.3) se deu pela soma das variâncias da precisão intermediária e do efeito matriz em cada um

dos níveis (5, 10 e 15 ng/mL). Para estimar a incerteza expandida do método, a incerteza combinada foi multiplicada por um fator de abrangência $k=2$ (WITEK et al, 2018). A incerteza expandida do método, calculada pelo ResVal para os analitos quantificáveis variou de 5 a 30%.

4.3.5 Verificação dos valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$

Todos os valores calculados de $CC\alpha$ e $CC\beta$ foram verificados experimentalmente.

Para a avaliação dos valores calculados de $CC\alpha$, seis amostras comprovadamente brancas (004/2018, 012/2018, 014/2018, 027/2018, 028/2018 e 029/2018) foram fortificadas no início do procedimento de extração com solução para fortificação no início contendo os analitos nas concentrações de 16,4 ng/mL de ERI, 87,6 ng/mL de ESP, 19,8 ng/mL de OLE, 51,36 ng/mL de TIL, 90 ng/mL de TILM e 200 ng/mL de ROX (padrão interno). Para a avaliação dos valores calculados de $CC\beta$, as mesmas seis amostras foram fortificadas no início do procedimento de extração com solução para fortificação no início contendo os analitos nas concentrações de 32,8 ng/mL de ERI, 175,2 ng/mL de ESP, 39,4 ng/mL de OLE, 102,4 ng/mL de TIL, 154 ng/mL de TILM e 200 ng/mL de ROX (padrão interno). Também foram preparadas como controle duas soluções no diluente, uma contendo os analitos nas concentrações equivalentes ao $CC\alpha$ de 0,547 ng/mL de ESP, 0,102 ng/mL de ERI, 0,124 ng/mL de OLE, 0,321 ng/mL de TIL, 0,562 ng/mL de TILM e 1,25 ng/mL de ROX (padrão interno), e outra solução contendo os analitos nas concentrações equivalentes ao $CC\beta$ de 1,09 ng/mL de ESP, 0,205 ng/mL de ERI, 0,246 ng/mL de OLE, 0,64 ng/mL de TIL, 0,962 ng/mL de TILM e 1,25 ng/mL de ROX (padrão interno).

Os picos das duas transições mais intensas dos analitos, presentes nas amostras fortificadas no início, foram verificados e apresentaram a razão sinal/ruído superior a 3,0.

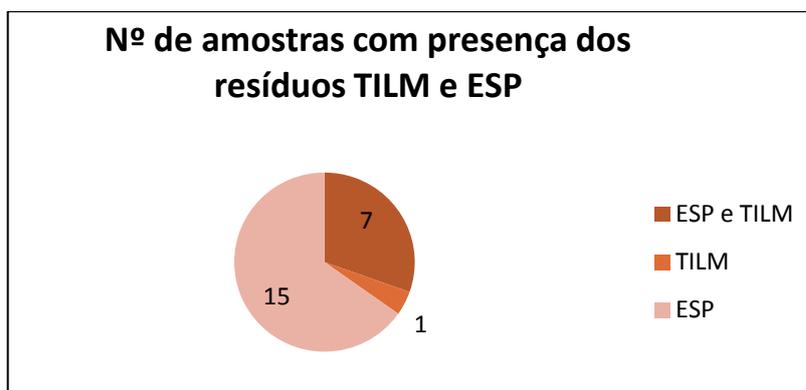
A partir dessa verificação concluiu-se que os valores calculados de $CC\alpha$ e $CC\beta$ para os analitos alvo são valores factíveis, ou seja, possíveis de serem detectados.

4.4 Avaliação da ocorrência de espiramicina, eritromicina, oleandomicina, tilosina e tilmicosina em fórmulas infantis para lactentes (tipo 1) e de seguimento para lactentes (tipo 2)

Das 32 amostras adquiridas, 30 foram analisadas para a avaliação da ocorrência dos analitos ERI, ESP, OLE, TIL e TILM, sendo 15 amostras de fórmulas infantis para lactentes (tipo 1) e 15 de fórmulas infantis de seguimento para lactentes (tipo 2). Embora o monitoramento de duas transições fosse suficiente, foram selecionadas três transições para cada analito, conforme o método validado.

Os resultados das análises das 30 amostras foram avaliados considerando os critérios para identificação e confirmação segundo Decisão 2002/657/EC descritas na seção 3.10.5 e em um total de 30 amostras, 23 (76,67%) foram confirmadas com a presença de pelo menos um dos analitos pesquisados, como mostra o **Gráfico 2**.

Gráfico 2 - Ocorrência de macrolídeos nas fórmulas infantis 1 e 2



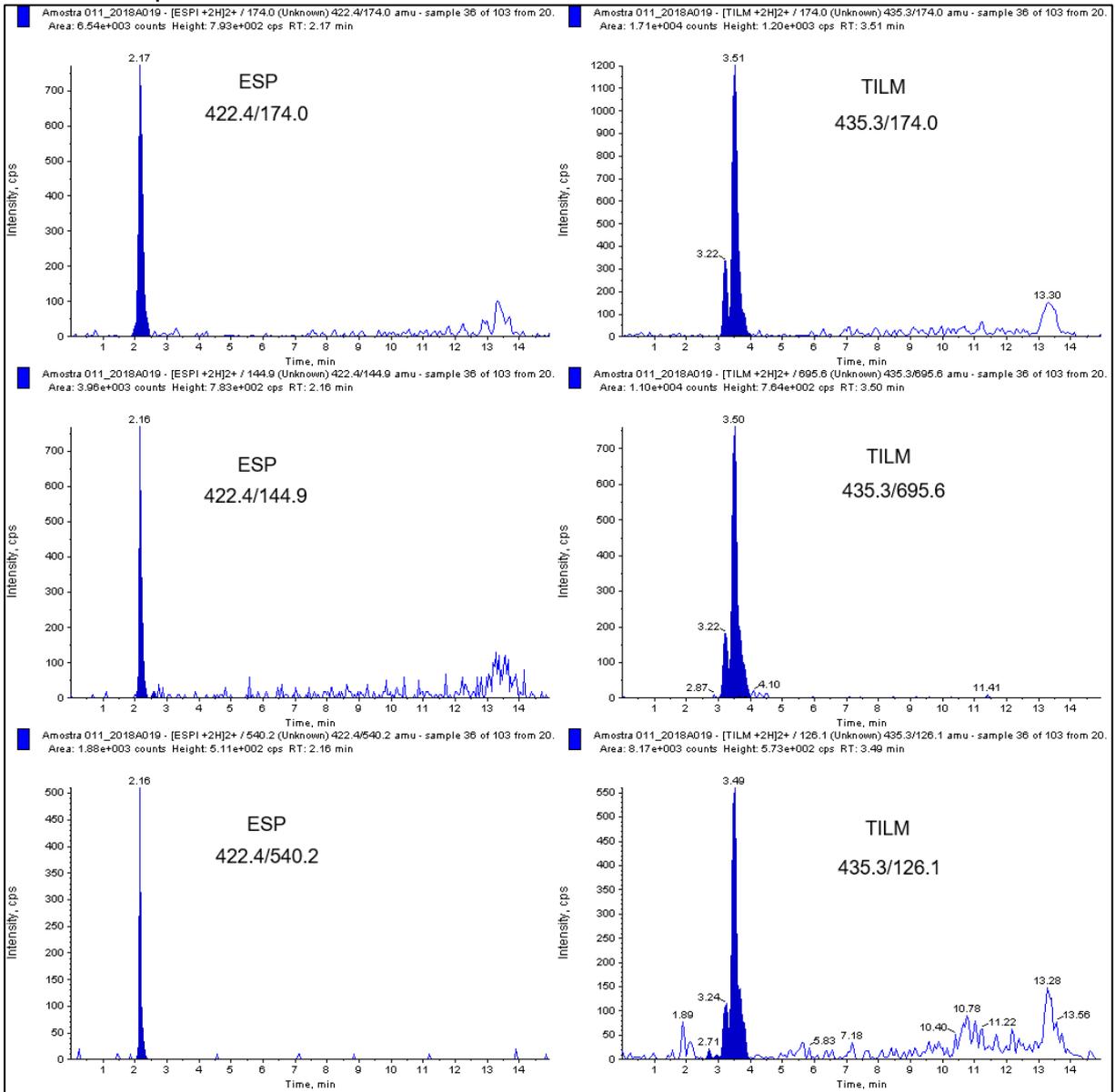
Fonte: (Da autora, 2019).

Vinte e duas amostras (73%) apresentaram resíduos de ESP e destas, 7 amostras (23,3%) também apresentaram resíduos de TILM. Uma única amostra foi confirmada apenas para TILM (3,33%). A presença dos resíduos OLE, ERI e TIL não foi confirmada em nenhuma amostra.

A **Figura 15** apresenta uma amostra identificada e confirmada com resíduo da ESP e TILM simultaneamente.

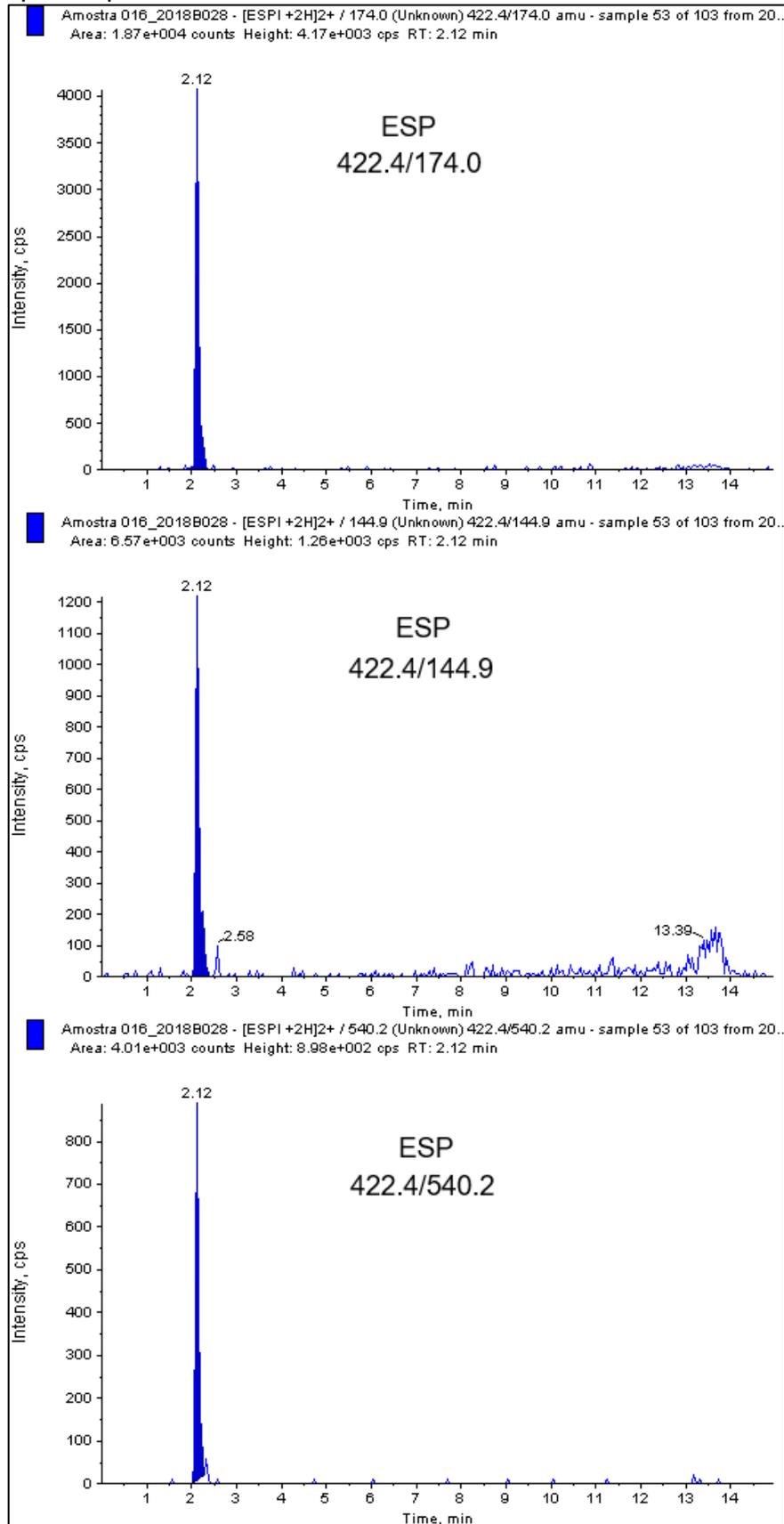
As **Figuras 16 e 17** apresentam uma amostra identificada apenas com ESP e com TILM, respectivamente.

Figura 15 - Cromatograma de íons extraídos da amostra 011/2018, identificada e confirmada para ESP e TILM



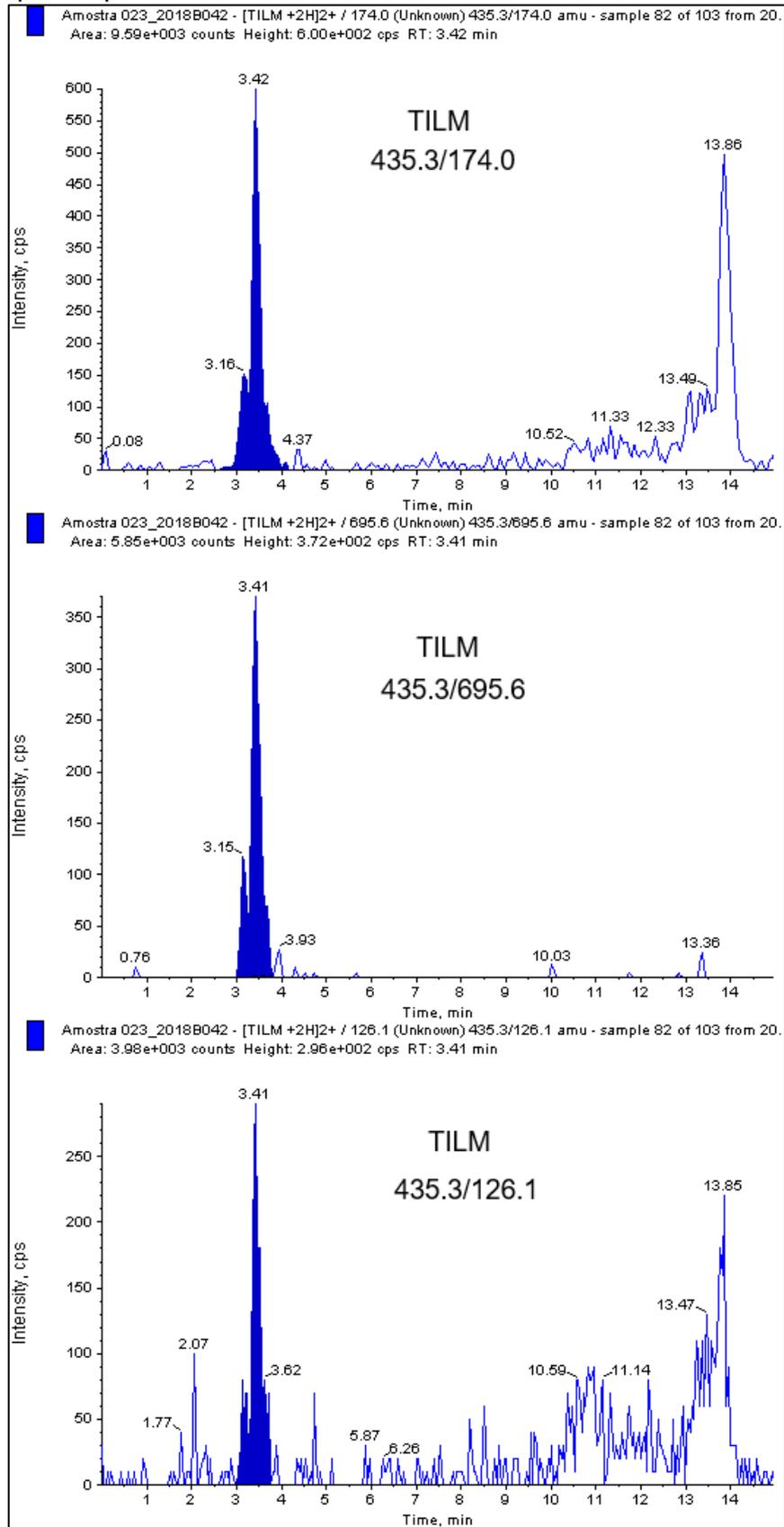
Fonte: (Da autora, 2019).

Figura 16 - Cromatograma de íons extraídos da amostra 016/2018, identificada e confirmada apenas para ESP



Fonte: (Da autora, 2019).

Figura 17 - Cromatograma de íons extraídos da amostra 023/2018, identificada e confirmada apenas para TILM



Fonte: (Da autora, 2019).

Vale ressaltar que todos os critérios para identificação e confirmação foram avaliados também para a amostra controle fortificada em CC α no início do procedimento para fins de controle e todos os analitos foram confirmados nesta amostra, como esperado. A **Figura 18** ilustra os resultados dos critérios de razão de íons e tempo de retenção relativo calculados para a amostra controle fortificada em CC α no início do procedimento.

Figura 18 - Resultados dos critérios de razão de íons (a) e tempo de retenção relativo (b) do analito ESP calculados para a amostra controle fortificada em CC α no início do procedimento no primeiro dia de experimento

(a)

ANALITO	Amostra fortificada no início em CC α	Área da amostra fortificada no início em CC α	Área da amostra fortificada no início em CC α	Razão de íons na amostra fortificada no início em CC α (%)	Amostra fortificada no final em CC α	Área da amostra fortificada no final em CC α	Área da amostra fortificada no final em CC α	Razão de íons na amostra fortificada no final em CC α (%)	Varição aceitável (%)	Intensidade relativa	Varição aceitável	
		174.0	144.9			174.0	144.9			> 50%	± 20%	
ESP+2H 422.4	Aliquota 1 - 1 ^o injeção	4,32E+04	2,15E+04	49,77	1 ^o injeção	4,94E+04	2,32E+04	46,96	35,22	58,70	> 20 a 50%	± 25%
	Aliquota 1 - 2 ^o injeção	4,61E+04	1,98E+04	42,95	2 ^o injeção	4,83E+04	2,22E+04	45,96	34,47	57,45	> 10 a 20%	± 30%
	Aliquota 2 - 1 ^o injeção	4,67E+04	2,34E+04	50,11							≤ 10%	± 50%
	Aliquota 2 - 2 ^o injeção	5,06E+04	2,34E+04	46,25								

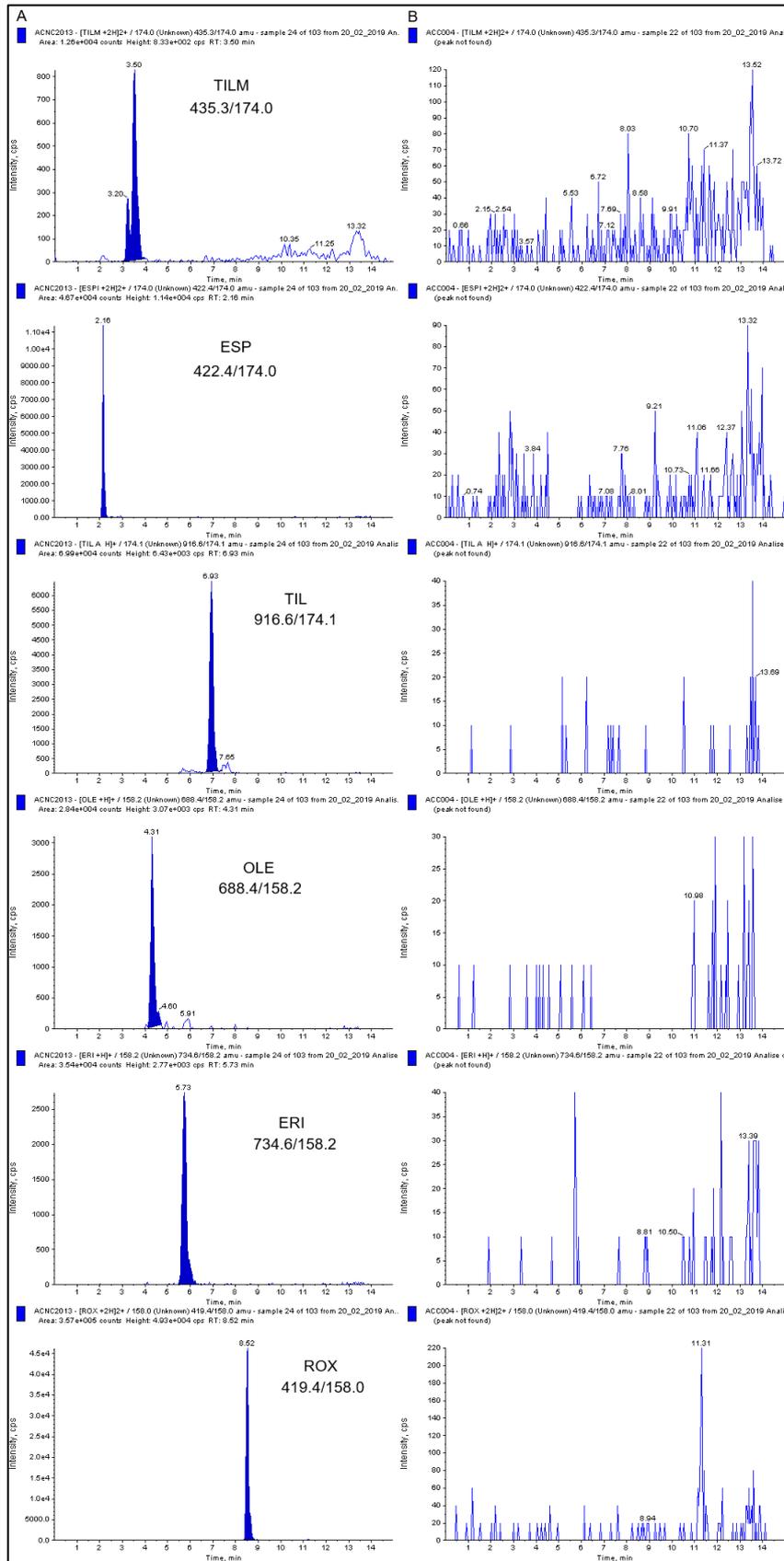
(b)

ANALITO		Amostra fortificada no início em CC α			Amostra fortificada no final em CC α			Varição aceitável		
		tR (min)	tR (min) ROXI +2H	tR relativo (min)	tR (min)	tR (min) ROXI +2H	tR relativo (min)			
		174.0	158.0		174.0	158.0				
ESP +2H 422.4	Aliquota 1 - 1 ^o injeção	2,15	8,51	0,253	Injeção 1	2,16	8,51	0,25	0,247	0,26
	Aliquota 1 - 2 ^o injeção	2,11	8,47	0,249	Injeção 2	2,12	8,46	0,25	0,244	0,26
	Aliquota 2 - 1 ^o injeção	2,16	8,52	0,254						
	Aliquota 2 - 2 ^o injeção	2,12	8,49	0,250						

Fonte: (Da autora, 2019).

A **Figura 19** apresenta os cromatogramas dos 5 analitos da amostra controle fortificada em CC α no início do procedimento e amostra controle branca de fórmula infantil no primeiro dia de experimento.

Figura 19 - Cromatogramas dos 5 analitos da amostra controle fortificada no CCa no início do procedimento e amostra controle branca de fórmula infantil



Fonte: (Da autora, 2019).

Das 22 amostras detectadas com ESP, 18 estavam acima do LOQ (0,36 ng/mL) e foram quantificadas a partir da transição de quantificação ($[\text{ESPI} + 2\text{H}]^2 + 422,4 / 174,0$). Quatro amostras apresentaram valores acima de LOD (0,11 ng/mL), porém abaixo de LOQ (0,36 ng/mL) e não foram quantificadas. Os valores das amostras que foram quantificadas variaram de 0,363 ng/mL a 1,34 ng/mL. A média das concentrações das amostras quantificadas das fórmulas infantis tipo 1 foi de 0,802 ng/mL e tipo 2 foi de 0,545 ng/mL. Como o método respondeu apenas como método qualitativo para a TILM, as amostras foram classificadas como não conformes para a presença deste resíduo, porém não foi possível a quantificação do analito.

Alguns métodos multiresíduos publicados na literatura foram validados para análise de fórmulas infantis e alguns macrolídeos fizeram parte da lista dos resíduos pesquisados. Aguilera et al. (2012), com um LOQ de 6,7 ng/mLµg/kg quantificou resíduo de TILM, com uma concentração de 17,1 µg/kg, em uma amostra analisada, num total de 9 amostras. Além da TILM, o método foi validado para TIL e ERI, com LOQs de 3,3 µg/kg e 0,3 µg/kg, respectivamente, porém estes dois analitos não foram detectados pelos autores. Zhan et al. (2013) avaliaram a presença de TILM, OLE, TIL e ERI com LOQs de 0,5 µg/kg, 1,0 µg/kg, 0,2 µg/kg e 1,0 µg/kg, respectivamente, e não confirmaram a presença destes macrolídeos em nenhuma das amostras analisadas. Zhao et al. (2017) avaliaram a presença de ESP, ERI, TILM, TIL e OLE com LOQs de 1,0 µg/kg, 50 µg/kg, 10 µg/kg, 50 µg/kg e 5 µg/kg, respectivamente. Estes macrolídeos não foram encontrados em nenhuma das amostras analisadas.

Valores reduzidos de LOD e o LOQ são fundamentais para a análise de substâncias que podem estar presentes em concentrações tão baixas. Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram a presença de TILM e/ou ESP em 76,7% das amostras e em especial a ESP foi detectada em 4 amostras e quantificada em 18 amostras analisadas com uma variação de 0,363 ng/mL a 1,34 ng/mL. O método desenvolvido por Zhao et al. (2017), que contempla a ESP, seria capaz de quantificar ESP em apenas 4 das amostras confirmadas neste estudo.

As fórmulas infantis são substitutas do leite humano e são produzidas principalmente a partir do leite da vaca, porém precisam apresentar o mesmo perfil nutricional do leite humano. Por isso, para a produção a partir do leite de vaca, é necessário que o mesmo seja desnatado e diluído para assemelhar-se aos

conteúdos de proteína, gordura e minerais do leite humano (FINN et al., 2018). Os lipídeos são a principal fonte de energia para os lactentes. A maior parte do conteúdo lipídico das fórmulas infantis é derivada de óleo vegetal adicionado, permitindo assim uma vida útil mais longa e um produto com conteúdo fixo que seja reprodutível (FINN et al., 2018; MAZZOCCHI et al., 2018). Altas concentrações de resíduos dos macrolídeos não são esperadas em fórmulas infantis, uma vez que suas moléculas são lipofílicas, além de poderem ser degradadas no seu processo de produção (ZORRAQUINO et al., 2011). Zorraquino et al. (2011) avaliaram os efeitos do tratamento térmico na atividade antimicrobiana de macrolídeos em leite e verificaram que uma temperatura de 120° C por 20 min resulta em uma perda da atividade maior que 93% da ERI, 64% da ESP e 51% da TIL. Quando foi utilizada uma temperatura de 140° C por 10 min, a perda de atividade foi de 30% para ERI, 35% para ESP e 12% da TIL. Costa (2014) avaliou a perda de concentração de tilosina A em leite após tratamento de pasteurização lenta, rápida e tratamento UHT e observou redução nas concentrações de 10,8%, 13,31% e 6,47%, respectivamente. A degradação térmica dos macrolídeos é dependente da temperatura e do tempo (TIAN et al., 2017). O processamento das fórmulas infantis visa garantir a qualidade nutricional e a máxima segurança alimentar. Na etapa de evaporação, a temperatura e a pressão são ajustadas e aplicadas para aumentar a concentração de sólidos totais da fórmula. Após esta etapa, segue-se com a etapa do tratamento UHT, que é um tratamento térmico que utiliza um pré - aquecimento a 75 - 85°C seguindo com um superaquecimento rápido à 140°C por 0,1 - 0,5 segundos. Este tempo precisa ser suficiente para garantir a inocuidade do produto, porém evitar danos aos componentes nutricionais (POULSEN, 2016).

Considerando os aspectos do processo de produção somado à característica lipofílica das moléculas dos macrolídeos, a presença dos seus resíduos nas fórmulas infantis sugere a possibilidade de valores bem mais elevados de concentração destes resíduos no leite utilizado como matéria prima. TILM e ESP são macrolídeos amplamente utilizados na pecuária leiteira no Brasil e a presença destas substâncias em concentrações mais elevadas no leite pode indicar o não cumprimento do período de carência estabelecido para uso (CRUZ et al., 2019). A presença de resíduos de macrolídeos, mesmo em concentrações bem reduzidas, em um grande número de amostras pode ser um sinalizador de uso indiscriminado, uma vez que essas substâncias são indicadas para o tratamento de animais com

mastites e não se espera que o seu uso seja preventivo. Cabe ressaltar que a ESP não é autorizada como aditivo na alimentação animal com finalidade de melhora de desempenho (BRASIL, 2012c). Como já citado anteriormente, Costa (2014) verificou presença de ESP em 21 amostras de leite das 41 adquiridas no Rio de Janeiro.

4.5 Avaliação da exposição dietética

A avaliação da exposição dietética diária aos resíduos de macrolídeos foi realizada com base nos cinco analitos selecionados e considerando os resultados do estudo de ocorrência. Para a ESP, as amostras apresentaram valores de concentrações quantificáveis, apenas detectáveis ou não foram detectáveis. Neste caso, os valores adotados foram as concentrações quantificadas, LOQ/2 (0,18 ng/mL) e LOD/2 (0,055 ng/mL), respectivamente. O analito TILM foi detectado em algumas amostras, porém não foi quantificado, uma vez que o método foi classificado apenas como qualitativo para esta substância. Neste caso, para as amostras detectadas foi adotado o valor de LOD (0,39 ng/mL para fórmula infantil do tipo 1 e 0,30 ng/mL para tipo 2) e para as amostras nas quais a TILM não foi detectada, o valor de LOD/2 (0,195 ng/mL e 0,15 ng/mL). Para os analitos ERI, OLE e TIL, nenhuma amostra apresentou resíduo detectado pelo método utilizado, sendo assim todos os valores adotados de concentração foram LOD/2 (0,02 ng/mL, 0,05 ng/mL e 0,185 ng/mL, respectivamente).

A avaliação da exposição foi feita considerando o valor mediano da concentração dos resíduos de cada analito nos diferentes lotes para cada marca, além da avaliação da exposição do pior caso (concentração mais alta entre os lotes de cada marca), em dois cenários de consumo. Os resultados da avaliação da exposição considerando o primeiro cenário, no qual os dados de consumo foram estimados pelas recomendações dos rótulos dos produtos estão apresentados na **Tabela 26.**

Tabela 26 - Resultados da avaliação da exposição dietética diária de lactentes de 0 a 11 meses (em mg/kg e % de IDA) considerando o primeiro cenário de consumo, utilizando o valor mediano e o valor mais alto de concentração dos resíduos (pior caso) entre lotes das diferentes marcas e sem distinção de marcas (global).

	Avaliação de exposição (Fabricante 1, marca A)		Avaliação de exposição (Fabricante 1, marca B)		Avaliação de exposição (Fabricante 2, marca A)		Avaliação de exposição (Fabricante 3, marca A)		Avaliação de exposição (Fabricante 3, marca B)		Avaliação de exposição global	
	Exposição dietética diária (Intervalo em mg/kg)		Exposição dietética diária (Intervalo em mg/kg)		Exposição dietética diária (Intervalo em mg/kg)		Exposição dietética diária (Intervalo em mg/kg)		Exposição dietética diária (Intervalo em mg/kg)		Exposição dietética diária (Intervalo em mg/kg)	
Analito	Mediana	Pior Caso										
ERI ^(a)	[1,96 x10 ⁻⁶ , 4,05 x10 ⁻⁶]	[1,47 x10 ⁻⁶ , 4,05 x10 ⁻⁶]	[1,47 x10 ⁻⁶ , 4,05 x10 ⁻⁶]	[1,96 x10 ⁻⁶ , 4,05 x10 ⁻⁶]								
ESP ^(b)	[1,76 x10 ⁻⁵ , 1,21 x10 ⁻⁴]	[6,88 x10 ⁻⁵ , 2,41 x10 ⁻⁴]	[1,76 x10 ⁻⁵ , 7,99 x10 ⁻⁵]	[8,07 x10 ⁻⁵ , 2,06 x10 ⁻⁴]	[4,04 x10 ⁻⁶ , 1,11 x10 ⁻⁵]	[4,04 x10 ⁻⁶ , 1,11 x10 ⁻⁵]	[5,67 x10 ⁻⁵ , 2,41 x10 ⁻⁴]	[5,84 x10 ⁻⁵ , 2,71 x10 ⁻⁴]	[3,77 x10 ⁻⁵ , 1,25 x10 ⁻⁴]	[5,39 x10 ⁻⁵ , 1,41 x10 ⁻⁴]	[6,19 x10 ⁻⁵ , 9,78 x10 ⁻⁵]	[8,07 x10 ⁻⁵ , 2,71 x10 ⁻⁴]
TIL ^(a)	[1,81 x10 ⁻⁵ , 3,74 x10 ⁻⁵]	[1,36 x10 ⁻⁵ , 3,74 x10 ⁻⁵]	[1,36 x10 ⁻⁵ , 3,74 x10 ⁻⁵]	[1,81 x10 ⁻⁵ , 3,74 x10 ⁻⁵]								
TILM ^(c)	[2,94 x10 ⁻⁵ , 7,89 x10 ⁻⁵]	[2,94 x10 ⁻⁵ , 7,89 x10 ⁻⁵]	[1,47 x10 ⁻⁵ , 7,89 x10 ⁻⁵]	[1,47 x10 ⁻⁵ , 7,89 x10 ⁻⁵]	[1,10 x10 ⁻⁵ , 3,95 x10 ⁻⁵]	[1,10 x10 ⁻⁵ , 3,95 x10 ⁻⁵]	[1,47 x10 ⁻⁵ , 3,95 x10 ⁻⁵]	[1,10 x10 ⁻⁵ , 3,95 x10 ⁻⁵]	[2,94 x10 ⁻⁵ , 7,89 x10 ⁻⁵]			
OLE ^(a)	[4,89 x10 ⁻⁶ , 1,01 x10 ⁻⁵]	[3,7 x10 ⁻⁶ , 1,1 x10 ⁻⁵]	[3,7 x10 ⁻⁶ , 1,1 x10 ⁻⁵]	[4,89 x10 ⁻⁶ , 1,01 x10 ⁻⁵]	[4,89 x10 ⁻⁶ , 1,01 x10 ⁻⁵]	[4,89 x10 ⁻⁶ , 1,01 x10 ⁻⁵]	[4,89 x10 ⁻⁶ , 1,01 x10 ⁻⁵]	[4,89 x10 ⁻⁶ , 1,01 x10 ⁻⁵]	[4,89 x10 ⁻⁶ , 1,01 x10 ⁻⁵]			
	% de IDA (Intervalo)		% de IDA (Intervalo)		% de IDA (Intervalo)		% de IDA (Intervalo)		% de IDA (Intervalo)		% de IDA (Intervalo)	
	Mediana	Pior Caso										
ERI ^(a)	[0,28, 0,58]	[0,28, 0,58]	[0,28, 0,58]	[0,28, 0,58]	[0,21, 0,58]	[0,21, 0,58]	[0,28, 0,58]	[0,28, 0,58]	[0,28, 0,58]	[0,28, 0,58]	[0,28, 0,58]	[0,28, 0,58]
ESP ^(b)	[0,04, 0,24]	[0,14, 0,48]	[0,04, 0,16]	[0,16, 0,41]	[0,01, 0,02]	[0,01, 0,02]	[0,11, 0,48]	[0,12, 0,54]	[0,08, 0,25]	[0,11, 0,28]	[0,12, 0,20]	[0,16, 0,54]
TIL ^(a)	[0,06, 0,12]	[0,06, 0,12]	[0,06, 0,12]	[0,06, 0,12]	[0,05, 0,12]	[0,05, 0,12]	[0,06, 0,12]	[0,06, 0,12]	[0,06, 0,12]	[0,06, 0,12]	[0,06, 0,12]	[0,06, 0,12]
TILM ^(c)	[0,07, 0,20]	[0,07, 0,20]	[0,04, 0,20]	[0,07, 0,20]	[0,03, 0,10]	[0,03, 0,10]	[0,04, 0,10]	[0,04, 0,10]	[0,04, 0,10]	[0,04, 0,10]	[0,03, 0,10]	[0,07, 0,20]

^(a) Todos os valores de concentração do resíduo foram definidos como LOD/2.

^(b) Valores quantificáveis, não quantificáveis e não detectáveis do resíduo foram definidos como o valor quantificado, LOQ/2 e LOD/2, respectivamente.

^(c) Valores detectáveis e não detectáveis do resíduo foram definidos como LOD e LOD/2, respectivamente.

Fonte: (Da autora, 2019).

Como a OLE não possui IDA estabelecida, foram calculados apenas os valores da exposição dietética diária. O resultado não foi comparado a nenhum valor de orientação para avaliar possibilidade de risco. Porém, a estimativa de exposição foi calculada considerando LOD/2 para todas as amostras, uma vez que o resíduo não foi detectado.

No primeiro cenário de consumo, as exposições diárias foram calculadas de forma específica para meninas e meninos. Nenhum valor calculado excedeu o valor de IDA estabelecido. Todas as amostras, independente de marca e fabricante, apresentaram valores bem abaixo do valor de orientação (IDA).

A partir dos valores obtidos foi possível observar que os lactentes estão mais expostos quando fazem uso de fórmulas infantis do tipo 1, de uma forma geral (considerando todas as marcas), sendo a utilização no 2º mês de vida o período mais crítico. Como exemplo, o **Gráfico 3** apresenta a tendência da exposição pelas estimativas das exposições diárias à ESP em mg/kg (eixo vertical), em relação a idade do lactente e tipo de fórmula infantil (eixo horizontal), para meninas e meninos nas diferentes marcas, considerando o pior caso, ou seja, a maior concentração nos diferentes lotes.

Gráfico 3 - Tendência de estimativa de exposição diária à ESP (mg/kg) de acordo com a idade do lactente e o tipo de fórmula infantil para amostras do fabricante 1, marca A (a), fabricante 1, marca B (b), fabricante 2, marca A (c), fabricante 3, marca A (d) e fabricante 3, marca B (e) (continua)

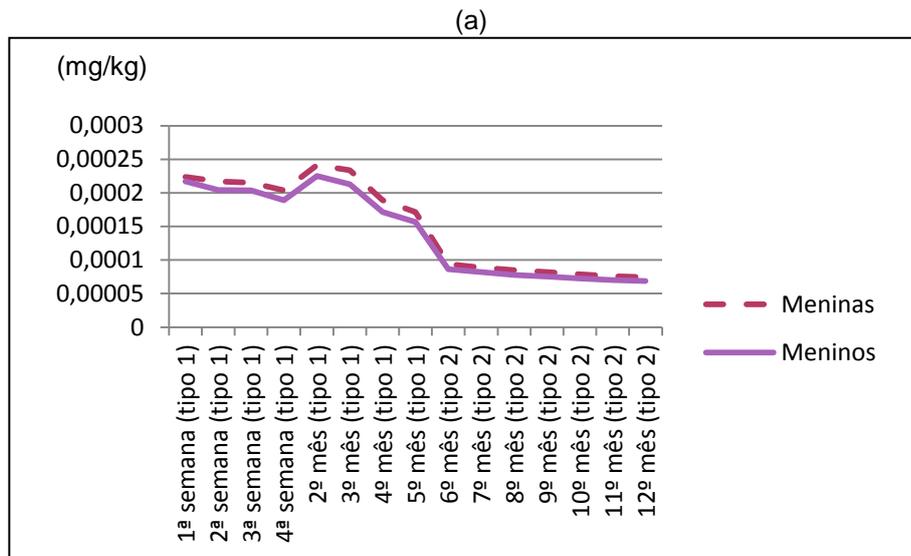
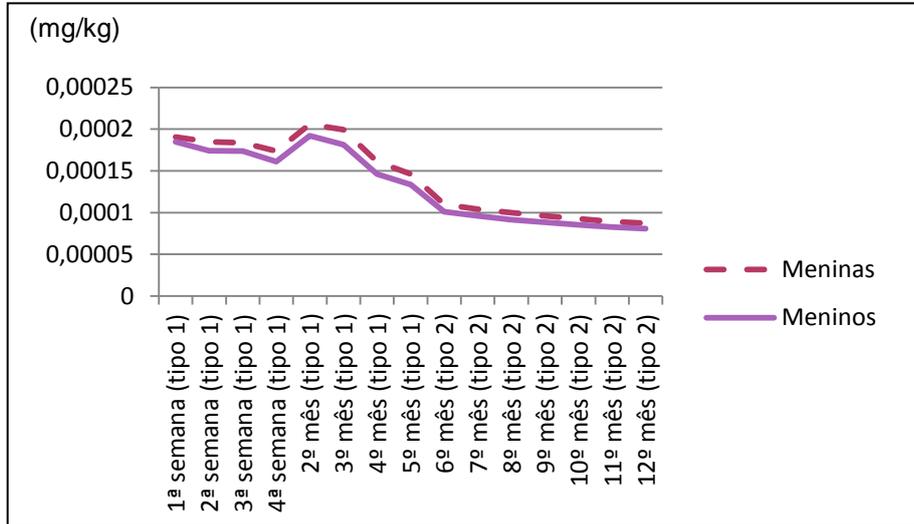
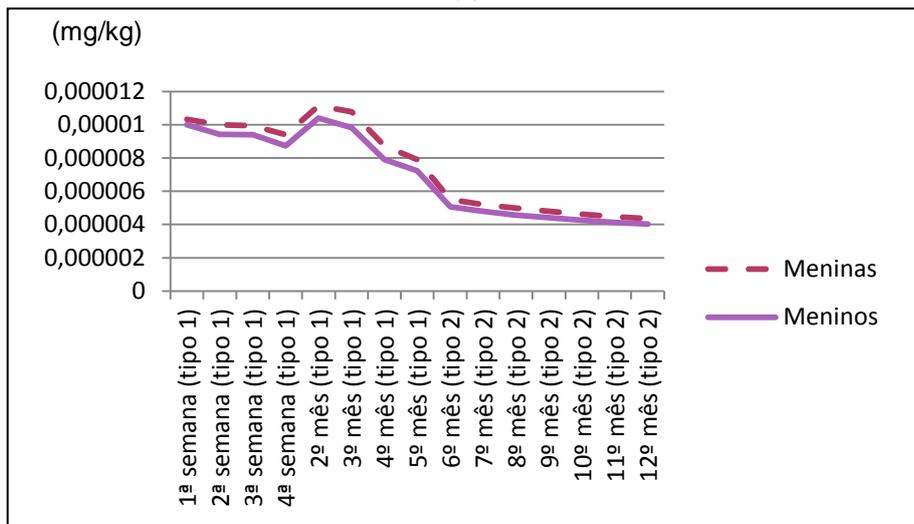


Gráfico 3 - Tendência de estimativa de exposição diária à ESP (mg/kg) de acordo com a idade do lactente e o tipo de fórmula infantil para amostras do fabricante 1, marca A (a), fabricante 1, marca B (b), fabricante 2, marca A (c), fabricante 3, marca A (d) e fabricante 3, marca B (e) (continuação)

(b)



(c)



(d)

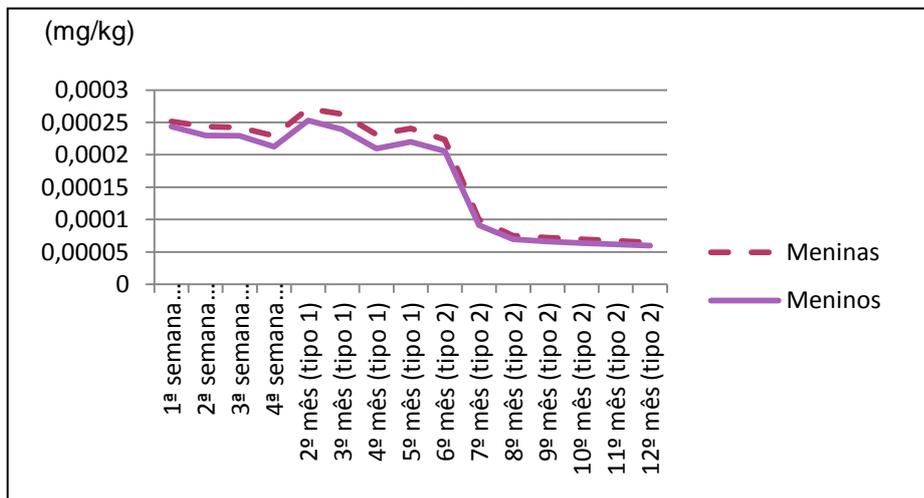
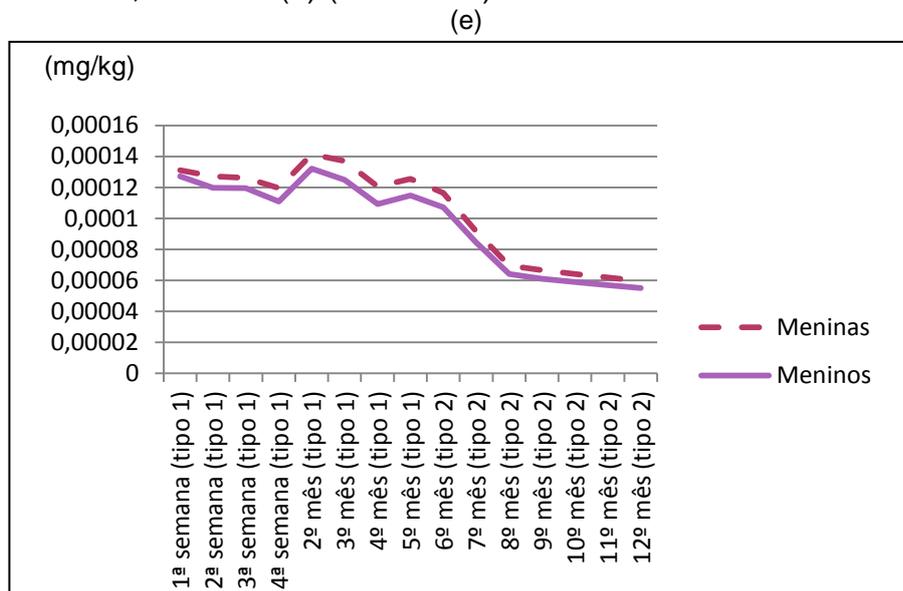


Gráfico 3 - Tendência de estimativa de exposição diária à ESP (mg/kg) de acordo com a idade do lactente e o tipo de fórmula infantil para amostras do fabricante 1, marca A (a), fabricante 1, marca B (b), fabricante 2, marca A (c), fabricante 3, marca A (d) e fabricante 3, marca B (e) (conclusão)



Fonte: (Da autora, 2019).

Os gráficos nos mostram também que as meninas estão sujeitas a uma exposição mais alta que os meninos, uma vez que seus pesos médios, segundo a OMS, possuem valores um pouco mais baixos. Outra observação importante a partir do gráfico (c) foi que mesmo com uma concentração fixa de ESP, uma vez que todos os valores foram determinados por LOD/2, pois não houve detecção de resíduo para o fabricante 2 da marca A, a mesma tendência de uma exposição mais alta nos primeiros meses, principalmente no segundo mês, também foi verificada. Essa característica deve-se ao fato destes produtos atenderem, por si só, as necessidades dos lactentes, podendo ser a única fonte de nutrientes até seis meses de vida, ou seja, há um grande consumo destes produtos por unidade de massa corporal. O mesmo panorama não foi observado nas exposições pelo uso de fórmulas do tipo 2, uma vez que são produtos utilizados como alimento complementar após o sexto mês e não foi considerado neste estudo o restante da alimentação dessa população.

Os resultados da avaliação de exposição de acordo com o segundo cenário de consumo, que considera um consumo de 750 mL de fórmula infantil por dia por um lactente de 3 meses e 5 kg, variou de uma forma geral (considerando todas as marcas) segundo a **Tabela 27**, calculadas exclusivamente para as fórmulas do tipo

1. Estes valores não excedem os valores calculados no primeiro cenário de consumo dentro da mesma faixa etária, resultado coerente, uma vez que a indicação de consumo é um pouco maior, 920 mL de fórmula/dia considerando 5,8 kg para meninas e 6,4 kg para meninos.

Tabela 27 - Comparação geral, considerando todas as marcas, entre as avaliações das exposições dietéticas diárias estimadas pela concentração mediana e pelo pior caso (maior concentração verificada entre os lotes das amostras) no primeiro e segundo cenários de consumo

	Intervalo (ou valor único ^(a)) do valor da exposição diária em relação à IDA (%)			
	Cálculo pela mediana		Cálculo pelo pior caso	
	1º Cenário (%)	2º Cenário (%)	1º Cenário (%)	2º Cenário (%)
ERI	0,41 – 0,49	0,43	0,41 – 0,49	0,43
ESP	0,02 – 0,41	0,02 – 0,36	0,02 – 0,46	0,02 – 0,36
TIL	0,09 – 0,11	0,09	0,09 – 0,11	0,0925
TILM	0,07 – 0,15	0,07 – 0,15	0,07 – 0,15	0,073 – 0,146
OLE ^(b)	(7,2 x 10 ⁻⁶) – (8,6 x 10 ⁻⁶)	7,5 x 10 ⁻⁶	(7,2 x 10 ⁻⁶) – (8,6 x 10 ⁻⁶)	7,5 x 10 ⁻⁶

^(a) Para casos nos quais foram utilizados o mesmo valor de concentração do resíduo, mesmo valor de consumo e mesmo peso para todas as marcas e que, conseqüentemente, os resultados da avaliação da exposição se mostraram iguais.

^(b) Valor da exposição diária estimada, uma vez que o analito não possui valor de IDA definido.
Fonte: (Da autora, 2019).

Os dados de peso e consumo são determinantes para a qualidade do resultado da avaliação da exposição. Os dados de consumo utilizados para a estimativa da exposição dietética efetuada nesta dissertação foram obtidos dos rótulos das fórmulas infantis, uma vez que as instruções para uso e preparo destes produtos deve estar de acordo com as recomendações da OMS e assumiu-se como premissa que as mães seguem essas recomendações (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b). Spungen et al. (2018), também estimaram a exposição de lactentes à 3 - monocloro - 1, 2 - propanediol e ésteres de glicidil em fórmulas infantis empregando valores de consumo baseados nas médias estimadas das necessidades enérgicas de cada faixa etária pela FAO/WHO e os pesos corporais medianos padrões. Há também a possibilidade de uso de estudos de dieta total que são baseados na população como um todo, além de estudos que levantam dados de consumos individuais. Martins et al. (2013) e Niu et al. (2015) conduziram um estudo de avaliação da exposição ao mercúrio e ao bisfenol A, respectivamente, a partir do uso de fórmulas infantis, utilizando valores de consumo baseados na população como

um todo. Em contrapartida, Morisset et al. (2013) e Ojuri et al. (2018) utilizaram estudos que levantaram dados de consumo individuais para avaliação da exposição de lactentes ao mercúrio e às micotoxinas com a utilização de fórmulas infantis

Valores de concentração não quantificáveis e não detectáveis são um ponto crítico na estimativa da avaliação da exposição dietética. Os métodos de triagem precisam superestimar as exposições de consumidores utilizando suposições conservadoras em termos de consumo e concentração do resíduo para rastrear casos em que representem preocupação e precisem de uma avaliação mais detalhada e refinada. A menos que não seja possível a presença de algum resíduo, por exemplo, nos casos em que a substância não é registrada ou que seu uso seja proibido, ou ainda em situações em que sejam totalmente removidos no processamento, é que deve-se presumir que as amostras estão livres do resíduo. Caso contrário, deve-se considerar valores que não foram quantificados ou detectados como abaixo de LOQ e LOD, respectivamente. Para atribuir valores nesses casos, uma opção é utilizar LOQ/2 e LOD/2. Assumiu-se um valor mediano em cada conjunto de concentrações, uma vez que devido ao grande número de dados abaixo de LOQ e LOD, estes valores distorceriam a média dos resultados (FAO/WHO, 2009b).

Um fator limitante no desenho do estudo efetuado foi o número de amostras de cada marca (n=3). Para superestimar a avaliação de exposição através do consumo, além da mediana, adotou-se também a concentração mais alta do conjunto de valores de cada marca (pior caso) com o objetivo de ser mais conservador na seleção dos dados, uma vez que os consumidores alvo pertencem a um grupo crítico por sua vulnerabilidade.

Todos os resultados calculados da exposição dietética ficaram abaixo dos valores de IDA, o que não sugere uma preocupação potencial, pois a IDA é definida de forma a proteger a vida humana em situações de exposição regular. Para o estabelecimento da IDA para produtos de uso veterinário microbiologicamente ativos, além dos efeitos toxicológicos e farmacológicos, é preciso considerar os efeitos prejudiciais desses ativos na microbiota intestinal. Os valores de IDA para a ESP, TILM, ERI e TIL foram estabelecidos considerando estes efeitos, porém estes valores são aplicados à população geral, não considerando subpopulações específicas (FAO/WHO, 1998; FAO/WHO, 2009c; FAO/WHO, 2006c; FAO/WHO, 2009d; FAO/WHO, 2009e; BOOBIS et al., 2017).

Como as estimativas de exposição obtidas foram inferiores às IDAs, nenhuma informação adicional sobre caracterização do risco precisa ser fornecida, porém a detecção de resíduos de produtos de uso veterinário em produtos processados contendo ingredientes de origem animal sugere a possibilidade da presença de seus metabólitos ou produtos de degradação para os quais não há avaliações para a definição de valores de orientação (FAO/WHO, 2009d; BOOBIS et al., 2017).

Em se tratando de fórmulas infantis, que não possuem LMRs ou tolerâncias definidas para resíduos de antimicrobianos pelas regulamentações atuais, não deve haver presença destas substâncias nestes produtos. Mesmo que os valores estimados de exposição estejam abaixo da IDA, as detecções de ESP e TILM configuram uma não conformidade com a legislação brasileira. Visto que lactentes podem apresentar algum tipo de efeito adverso a partir de doses mais baixas quando comparadas aos adultos é fundamental que sejam definidos valores de orientação, isto é, níveis seguros de exposição para resíduos de antimicrobianos, específicos para essa subpopulação.

A avaliação da exposição foi realizada com a característica de ser uma avaliação pós-regulação, em amostras comercializadas na cidade do Rio de Janeiro. Utilizou-se uma abordagem de triagem mais refinada, por considerar subpopulações específicas, com idades específicas, em diferentes cenários de consumo e abordagens de concentrações. Assumiu-se a premissa da possibilidade da presença de resíduos baseado no fato de que estudos já evidenciaram a presença de macrolídeos em leite, matéria-prima empregada na produção das fórmulas infantis (COSTA, 2014). Não foi abordada nesse trabalho a coexposição a mais de um macrolídeo em uma mesma amostra. Estudos considerando este aspecto devem ser valorizados e estão em discussão (OECD, 2018).

5 CONCLUSÃO

Os macrolídeos são antimicrobianos amplamente utilizados na pecuária leiteira e possuem LMR estabelecidos para leite. Entretanto, como não há limites ou tolerâncias estabelecidas para fórmulas infantis na legislação brasileira, estes produtos precisam ser livres de resíduos.

Um método analítico foi validado com sensibilidade compatível ou superior aos métodos até o momento encontrados na literatura para a análise de resíduos de cinco macrolídeos em fórmulas infantis para lactentes e de seguimento para lactentes. Valores de LOQ e LOD foram suficientemente baixos para quantificar ou detectar resíduos de ESP em 22 amostras e TILM em 8. Em um total de 30 amostras analisadas, 23 apresentaram pelo menos 1 dos antimicrobianos pesquisados e portanto, estavam não conformes. Os resultados da avaliação de exposição, calculados separadamente para cada analito pesquisado, não sugeriram uma preocupação potencial pelo consumo de fórmulas infantis por lactentes. Estudos considerando os efeitos da exposição simultânea a múltiplos resíduos precisam ser efetuados.

Por se tratar de produtos destinados a uma população mais sensível à presença de resíduos, as agências reguladoras e fiscalizadoras precisam otimizar o uso de antimicrobianos em animais em lactação e restringir o uso do leite proveniente de animais que foram tratados com esses medicamentos para a produção das fórmulas infantis. O período de carência dos produtos à base de antimicrobianos usados em animais produtores de leite é estabelecido considerando o LMR para a matriz leite cru e não engloba produtos processados que empregam o leite como matéria prima, como as fórmulas infantis. Os macrolídeos presentes no leite utilizado para a produção de fórmulas infantis podem resistir às etapas do processamento e estarem presentes no produto final, como verificado neste trabalho. Portanto, o período de carência para produtos antimicrobianos utilizados em animais que produzem leite destinado à fabricação de fórmulas infantis precisa ser diferenciado. Outra alternativa para evitar a presença de resíduos nestes produtos seria o uso de leites provenientes de produção orgânica.

Até o presente momento, segundo meu conhecimento, este é o primeiro estudo abordando avaliação da exposição dietética aos antimicrobianos a partir do uso de fórmulas infantis.

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, E.; SAUNDERS, C.; LACERDA, E.M.A. **Nutrição em obstetrícia e pediatria**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2002.
- AFFOLTER, M. *et al.* Qualitative and quantitative profiling of the bovine milk fat globule membrane proteome. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 1079-1088, abr. 2010.
- AGUILERA-LUIZ, M.M. *et al.* Multiclass method for fast determination of veterinary drug residues in baby food by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, p. 2171-2180, jun. 2012.
- AHN, S. *et al.* Exact Matrix-matching Calibration by Standard Addition-Isotope Dilution-Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Accurate Determination of Chloramphenicol in Infant Formula. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 38, n. 8, p. 904-910, jul. 2017.
- ANJOS, M.R. *et al.* Multiresidue Method for simultaneous analysis of Aflatoxin M1, Avermectins, Organophosphate Pesticides and Milbemycim in milk by Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to tandem mass Spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, maio 2016
- BESSAIRE, T. *et al.* Screening of 23 β -lactams in foodstuffs by LC-MS/MS using an alkaline QuEChERS-like extraction. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n.4, jan. 2018.
- BEYENE, T. Veterinary drug residues in food-animal products: Its risk factors and potential effects on public health. **Veterinary Science & Technology**, v.7, n.1, p. 285, 2016.
- BOOBIS, A. *et al.* Characterizing chronic and acute health risks of residues of veterinary drugs in food: latest methodological developments by the joint FAO/WHO expert committee on food additives. **Critical Reviews in Toxicology**, v.47, n.10, p. 889-903, jul. 2017.
- BORTOLINI, G.A. *et al.* Early cow`s milk consumption among Brazilian children: results of a national survey. **Journal de Pediatria**, v. 89, n. 6, p. 608-613, abr. 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria Nº 977, de 5 de dezembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente à Fórmulas Infantis para Lactentes e às Fórmulas Infantis de segmento. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 Dez. 1998. Disponível em: http://www.nutricaoemfoco.com.br/NetManager/documentos/portaria_no_977,_de_5_de_dezembro_de_1998.pdf. Acesso em: 8 abr. 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa SDA/MAA 42/1999**. Plano Nacional de controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem animal. Brasília, 1999. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional->

de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/instrucao-normativa-sda-n-o-42-de-20-de-dezembro-de-1999.pdf/view. Acesso em: 08 abr. 2019.

BRASIL. Presidência da República. **Lei nº 8.080 de setembro de 1990**. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Brasília, 1990. Disponível em : http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L8080.htm. Acesso em: 09 out. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diretrizes para Gerenciamento de Risco em Farmacovigilância**. Brasília, 2008a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33868/2893724/Diretrizes+para+o+Gerenciamento+do+Risco+em+Farmacovigil%C3%A2ncia/c24b0770-edb4-4367-944d-6f4994c56bd1>. Acesso em: 18 set. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota técnica 01/2017**: avaliação do risco dietético e adoção de medidas administrativas. Referência: Laudos de análise fiscal de programas de monitoramento de agrotóxicos estaduais. Brasília, 2017a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117833/NOTA+T%C3%89CNICA+01-2017/0bda3db8-ed96-43d3-8089-d95950cc83cf>. Acesso em: 20 set. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Plano de Ação da Vigilância Sanitária em Resistência aos Antimicrobianos**. Brasília, 2018c. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/3487091/3697444/Plano+de+a%C3%A7%C3%A3o+da+vigil%C3%A2ncia+sanit%C3%A1ria/09f85d62-bc23-4ccf-8c86-0a6431a355f9>. Acesso em: 24 fev. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet**: monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo (5º e 6º anos de atividades). Brasília, 2009a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395364/PAMVET.pdf/4777c371-e5b5-42e0-9c3f-43670009a802>. Acesso em: 30 ago. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório Anual – Ano:2008**: Gêneria Geral de Alimentos. Brasília, 2008b. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/396481/Relat%C3%B3rio+de+Atividade+s+da+GGALI++2008/0080e5eb-3523-47d2-ae9-625d962a2e55>. Acesso em: 8 abr. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 43, de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 set. 2011a. Disponível em: http://www.ibfan.org.br/site/wp-content/uploads/2014/06/Resolucao_RDC_n_43_de_19_de_setembro_de_2011.pdf. Acesso em: 23 mar. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 44, de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis de

seguimento para lactentes e crianças de primeira infância. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 set. 2011b.

Disponível em:

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0044_19_09_2011.html.

Acesso em: 23 mar. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 45, de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 set. 2011c. Disponível em:

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/rdc0045_19_09_2011.pdf.

Acesso em: 23 mar. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 45, de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 fev. 2011d. Disponível em:

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html.

Acesso em: 23 mar. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 53, de 02 de outubro de 2012**. Brasília 2012a. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/RDCN53.pdf/4f53a37a-03a9-4b8e-80eb-a31cc01964fa>. Acesso em: 23 mar. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 193, de 12 de dezembro de 2017**. Estabelece os Limites Máximos Tolerados (LMT) dos contaminantes arsênio inorgânico, cádmio total, chumbo total e estanho inorgânico em alimentos infantis, e dá outras providências. Brasília, 2017b. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2862128/RDC_193_2017_.pdf/38fa96de-6f24-4a0a-a872-3fe8ba5d79c7. Acesso em: 8 abr. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de garantia de qualidade analítica: resíduos e contaminantes em alimentos**. Brasília: MAPA/ACS, 2011e.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários**: CGAL/SDA. Brasília: MAPA/ACS, 2011f.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº11 de 22 de maio de 2012**. Publica o Subprograma de Monitoramento em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Pescado, Mel, Ovos e Avestruz para o exercício de 2012, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal. Brasília, 2012b. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional->

de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/pncrc-2012.pdf.
Acesso em: 17 fev. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº14 de 17 de maio de 2012**. 2012c. Disponível em:
<<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-14-de-17-de-maio-de-2012.pdf>> Acesso em: 30 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dez passos para uma alimentação saudável: guia alimentar para crianças menores de 2 anos**. 2.ed. Brasília: Ministério da saúde, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº2.775, de 22 de dezembro de 2016. Institui o Comitê encarregado de elaborar e conduzir o componente do setor saúde do Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (CIPAN), no âmbito do Ministério da Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 dez. 2016. Disponível em: <http://www.cosemsrn.org.br/wp-content/uploads/2017/01/portaria2775.pdf>. Acesso em : 04 maio 2018

BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde da Criança: nutrição infantil – aleitamento materno e alimentação complementar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018a. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/20/af-pan-br-17dez18-20x28-csa.pdf>. Acesso em: 24 fev. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos, no Âmbito da Agropecuária**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCRC/Animal**. 2018d. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>. Acesso em: 24 fev. 2019.

BS. British Standard. **ISO 11843-2:2000**: capability of detection – part 2: Methodology in the linear calibration case. 2008

CAC. Codex Alimentarius Commission. CAC/GL 71-2009: **guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals**: Adopted 2009. Revision 2012, 2014. Rome, 2014. 42p.

CODEX ALIMENTARIUS. **CODEX STAN 72-1981**. Standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants. 2007. Disponível em: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/fr/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2B72-1981%252FCXS_072e.pdf. Acesso em: 08 abr 2019.

COSTA, E.A. (org.). **Vigilância Sanitária: temas para debate**. Salvador: EDUFBA, 2009.

COSTA, E.A.; ROZENFELD, S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. *In*: ROZENFELD, S. (org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2000. p. 15-40.

COSTA, R.P. **Avaliação da estabilidade do antibiótico macrolídeo tilosina em leite submetido a diferentes condições de processamento térmico**. 2014. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

COSTA, R.P. *et al.* Innovative mixture of salts in the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for the extraction of residual macrolides in milk followed by analysis with liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 38, p. 3743-3749, nov. 2015.

CRUZ, A. G. *et al.* **Microbiologia, higiene e controle de qualidade no processamento de leites e derivados**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.

DESMARCHELIER, A. *et al.* Determination of 105 antibiotic, anti-inflammatory, antiparasitic agents and tranquilizers by LC-MS/MS based on an acidic QuEChERS-like extraction. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n.4, abr. 2018.

DÍAZ-BAO, M. *et al.* Fast HPLC-MS/MS Method for Determining Penicillin Antibiotics in Infant Formulas Using Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2015, 8 p., fev. 2015.

EFSA. European Food Safety Authority. **EFSA Strategy 2020: trusted science for safe food: protecting consumer health with independent scientific advice on the food chain**. Parma, Itália, 2016. Disponível em: https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/strategy2020.pdf. Acesso em: 22 mar. 2019.

ENANI. **Estudo Nacional de Aleitamento e Nutrição Infantil**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2019. Disponível em: <https://enani.nutricao.ufrj.br/index.php/pagina-exemplo/>. Acesso em: 07 abr. 2019.

FAO. **The FAO action plan on antimicrobial resistance 2016-2020**. Rome, 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5996e.pdf>. Acesso em: 20 set. 2017.

FAO/WHO. **Codex Alimentarius Commission**: procedural manual. 25. ed. Rome, 2016a. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/procedures-strategies/procedural-manual/pt/>. Acesso em: 19 set. 2017.

FAO/WHO. Codex Alimentarius. **General standard for contaminants and toxins in food and feed (CODEX STAN 193-1995)**. Geneva, 2018a. Disponível em: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/fr/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2B193-1995%252FCXS_193e.pdf. Acesso em: 07 abr. 2019.

FAO/WHO. **Dietary exposure assessment of chemicals in food**: report of a joint FAO/WHO consultation. Anapolis, Maryland, USA, 2-6 may 2005. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44027/1/9789241597470_eng.pdf. Acesso em: 20 set. 2017.

FAO/WHO. Dietary exposure assessment of chemicals in food. *In*: WHO. **Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food**. Geneva, 2009b. (Environment health criteria, 240). Chapter 6. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/chemical-food/en/>. Acesso em: 18 set. 2017.

FAO/WHO. Dose-response assessment and derivation of health-based guidance values. *In*: WHO. **Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food**. Geneva, 2009c. (Environment health criteria, 240). Chapter 5. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44065/WHO_EHC_240_8_eng_Chapter5.pdf?sequence=8. Acesso em: 17 mar. 2019.

FAO/WHO. **Evaluation of certain veterinary drug residues in food**. Geneva, 2006c. (WHO Technical Report Series, 939). Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43464/9241209399_eng.pdf?sequence=1. Acesso em: 26 mar. 2019.

FAO/WHO. **Evaluation of certain veterinary drug residues in food**. Geneva, 1998. (WHO Technical Report Series 879). Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42127/WHO_TRS_879.pdf?sequence=. Acesso em: 17 mar. 2019.

FAO/WHO. **Evaluation of certain veterinary drug residues in food**. Geneva, 2009e. (WHO Technical Report Series, 954). Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44085/WHO_TRS_954_eng.pdf?sequence=1. Acesso em: 17 mar. 2019.

FAO/WHO. **Evaluation of certain veterinary drug residues in food**. Geneva, 2016b. (WHO Technical Report Series, 997). Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204670/1/9789240695504_eng.pdf. Acesso em: 20 set. 2017.

FAO/WHO. **Evaluation of certain veterinary drug residues in food**. Geneva, 2018b. (WHO Technical Report Series 1008). Disponível em:

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259895/9789241210171-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 14 mar. 2019.

FAO/WHO. **Joint FAO/WHO expert meeting on dietary exposure assessment methodologies for residues of veterinary drugs**: final report including report of stakeholder meeting. Rome, 2012. Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/jecfa/Dietary_Exposure_Assessment_Methodologies_for_Residues_of_Veterinary_Drugs.pdf. Acesso em: 20 set. 2017.

FAO/WHO. **Pilot of new approaches to estimate dietary exposure to veterinary drug residues**. Geneva, 2014. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/chem/Annex1_Pilot_of_Dietary_Exposure_Assessment.pdf. Acesso em: 20 set. 2017.

FAO/WHO. Risk assessment and its role in risk analysis. *In*: WHO. **Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food**. Geneva, 2009a. (Environment health criteria, 240). Chapter 2. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/chemical-food/en/>. Acesso em: 18 set. 2017.

FAO/WHO. Risk characterization. *In*: WHO. **Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food**. Geneva, 2009d. (Environment health criteria, 240). Chapter 7. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44065/WHO_EHC_240_10_eng_Chapter7.pdf?sequence=10. Acesso em: 17 mar. 2019.

FAO/WHO. Summary and Conclusions. *In*: MEETING (RESIDUES OF VETERINARY DRUGS), 66., 22-28 feb. 2006, Rome, Italy. Rome: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, mar. 2006b. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-at875e.pdf>. Acesso em: 09 jun. 2019.

FAO/WHO. **Updating the principles and methods of risk assessment**: MRLs for pesticides and veterinary drugs. Rome, 2006a. Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/bilthoven_2005.pdf. Acesso em: 09 jun. 2019.

FDA. The Food and Drug Administration. **Risk Analysis at FDA**: Food Safety. A science-based approach to policy decisions. Silver Spring, MD, 2011. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/UCM267257.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2019.

FINN, S. *et al.* Early life nutrition. **Science Progress**. v. 101, n. 4, p. 332-359, 2018.

GAO, S. *et al.* Ultrasound-assisted ionic liquid/ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of sulfonamides in infant formula milk powder using high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 99, p. 875-882, jul. 2012.

GAYNOR, M.; MANKIN, A. Macrolide antibiotics: Binding site, mechanism of action, resistance. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 9, p.949-960, 2005.

HANG, H.P. *et al.* **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

HERRERA-HERRERA, A.V. *et al.* Determination of quinolone residues in infant and young children powdered milk combining solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7608-7614, mai. 2011.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**: documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008. Revisão 07, 2018.

INCQS. **POP 65.3120.135**: validação das funções de calibração usando o software estatística[®] 8.0. Ver. 3. Rio de Janeiro, 2015a. 15 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INCQS. **POP 65.3120.136**: Métodos de análise para resíduos de medicamentos veterinários em alimentos: protocolo de validação. Rev. 3 Rio de Janeiro, 2015b. 58p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

JARDIM, A.N.O.; CALDAS, E.D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1898 -1909, jul. 2009.

KANO, S.; RUBIN, B.K. Mechanism of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 590-615, jul. 2010.

LECLERCQ, R. Mechanism of resistance of macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. **Antimicrobial Resistance**, v. 34, p. 482-492, jan. 2002.

LUCCHESI, G. **Globalização e regulação sanitária: Os rumos da vigilância sanitária no Brasil**. 2001. 326 p. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

MACLACHLAN, D.J.; MUELLER, U. A refined approach to estimate exposure for use in calculating the maximum residue limit of veterinary drugs. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 62, p. 99-106, fev. 2012.

MARTINS, C. *et al.* Total mercury in infant food, occurrence and exposure assessment in Portugal. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 6, n. 3, p. 151-157, abr. 2013.

MAZZEI, T. *et al.* Chemistry and mode of action of macrolides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 31 (C), p. 1-9, 1993.

MAZZOCCHI, A. *et al.* The role of lipids in human milk and infant formulae. **Nutrients**, v. 10, p. 567, maio 2018.

MILLER, J. N.; MILLER, J.C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6. ed. Harlow: Person Education Limited, 2010.

MORISSET, T. *et al.* Probabilistic mercury multimedia exposure assessment in small children and risk assessment. **Environment International**, v. 59, p. 431-441, set. 2013.

NIU, Y. *et al.* Bisphenol A and nonylphenol in foodstuffs: Chinese dietary exposure from the 2007 total diet study and infant health risk from formulas. **Food Chemistry**, v. 167, p. 320-325, jan. 2015.

OECD. **Considerations for assessing the risks of combined exposure to multiple chemicals**. Paris, 2018. (Series on Testing and Assessment, n. 296). Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/considerations-for-assessing-the-risks-of-combined-exposure-to-multiple-chemicals.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2019.

OIE. World Organisation for Animal Health. **The OIE strategy on antimicrobial resistance and the prudent use of antimicrobials**. Paris, 2016. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/PortailAMR/EN_OIE-AMRstrategy.pdf. Acesso em: 20 set. 2017.

OIE. World Organisation for Animal Health. **OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance**. Paris, 2018. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_OIE_List_antimicrobials_May2018.pdf. Acesso em: 24 fev. 2019.

OJURI, O. T. *et al.* Assessing the mycotoxicological risk from consumption of complementary foods by infants and young children in Nigeria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 37-50, nov. 2018.

OMS. **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana**: opções de ação: sumário executivo. Genebra, 2012. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf. Acesso em: 08 abr. 2019.

PACHECO-SILVA, E.; SOUZA, J.R.; CALDAS, E.D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova**, v.37, n.1, p. 11 -112, 2014.

POULSEN, F. Infant formula on the production line. **Food Quality and Safety**, 2016.

PRESTES, O. D. *et al.* QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620 – 1634, jul. 2009.

RODRIGUEZ, E.; MORENO-BONDI, M.C.; MARAZUELA, M.D. Development and validation of a solid-phase extraction method coupled to liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of fluoroquinolone residues in powdered infant formulae Application to the analysis of samples from the Spanish and Latin American market. **Journal of Chromatography A**, v. 1209, p. 136-144, out. 2008.

RODRIGUEZ, E. *et al.* Optimization of a pressurized liquid extraction method by experimental design methodologies for determination of fluoroquinolone residues in infant foods by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 605-613, jan. 2010.

SHAH, R. *et al.* Dietary exposures for the safety assessment of seven emulsifiers commonly added to foods in the United States and implications for safety. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 34, n. 6, p. 905-917, jun. 2017.

SHIMADZU. **Shimadzu Technical Report Nº SSI-TR01**: setting optimum dwell, pause and scan event times on the shimadzu LCMS – 8030. 2011.

SILVA, A.V.F.G.; LANA, F.C.F. Significando o risco sanitário: modos de atuação sobre o risco na vigilância sanitária. **Revista Vigilância Sanitária em Debate**, v. 2, n. 2, p. 17-26, 2014.

SINDAN. **Compêndio de produtos veterinários**. São Paulo, SP. Disponível em: sistemas.sindan.org.br/cpvs/. Acesso em: 24 fev. 2019.

SONG, X. *et al.* Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of ten macrolide drugs residues in animal muscles by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 208, p. 169-176, out. 2016.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. Agentes Antimicrobianos. *In*: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap. 34. p. 407-500.

SPISSO, B.F. **Inocuidade de alimentos de origem animal**: determinação de resíduos de ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosamidas em ovos e de tetraciclina em leite por CLAE-EM/EM. 2010. 188p. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

SPUNGEN, J. H. *et al.* Estimates US infant exposure to 3-MCPD esters and glycidyl esters from consumption of infant formula. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 6, p. 1085-1092, jun. 2018.

STOEV, G.; NAZAROV, V. Identification of the related substances of tilmicosin by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 12, p.1993–1998, jun. 2008.

THOMPSON, N. AMC Technical Brief: Is my calibration linear? **Analytical Methods Committee**, AMCTB, n. 3, 2005.

TIAN, L.; KHALIL, S.; BAYEN, S. Effect of thermal treatments on the degradation of antibiotic residues in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 7, p. 3760-3770, jun. 2017.

UNIÃO EUROPEIA. Comissão das Comunidades Europeias. **2002/657/CE**. Decisão da Comissão de 14 de Agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. Bruxelas, 2002.

UNICEF BRASIL. **Aleitamento materno**. Brasília, 2016. Disponível em: http://www.unicef.org/brazil/pt/activities_10003.htm. Acesso em: 20 out. 2016.

WANG, J.; LEUNG, D.; LENZ, S.P. Determination of five macrolide antibiotic residues in raw milk using liquid chromatograph-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2873-2880, abr. 2006.

WHO. **Breastfeeding**. Geneva, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/topics/breastfeeding/en/>. Acesso em: 8 abr 2019.

WHO. **Critically important antimicrobials for human medicine**. 5. rev. 2016. Geneva, 2017a. Disponível em : <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255027/1/9789241512220-eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 31 maio 2017.

WHO. **Evaluation of the Joint FAO/WHO Experting Comitte on food additives (JECFA)**. Geneva, 2019. Disponível em: <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/search.aspx>. Acesso em: 14 mar. 2019.

WHO. **Global action plan on antimicrobial resistance**. Geneva, 2015. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763_eng.pdf?ua=1. Acesso em: 20 set. 2017.

WHO. **Monitoring exposure to food chemicals**: collecting worldwide food chemical exposure data to support the establishment of food safety standards. Geneva, 2017b. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemical-risks/GEMS-overview-2017.pdf?ua=1. Acesso em: 20 set. 2017.

WHO. **WHO Child Growth Standards** : length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: methods and development. Geneva: World Health Organization, 2006. Disponível em: https://www.who.int/childgrowth/standards/Technical_report.pdf?ua=1. Acesso em: 14 mar. 2019.

WITEK, S. *et al.* Analysis of thyreostats in bovine feces using ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v.41, n. 5, p. 1083-1090, mar. 2018.

WOZNIAK, B. *et al.* Determination of natural and synthetic oestrogens in surface water using gas chromatography-mass spectrometry. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 58, p. 603-611, nov. 2014a.

WOZNIAK, B. *et al.* Determination of the thyreostats in animal feeding stuffs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 58, p. 413-419, ago. 2014b.

WOZNIAK, B. *et al.* Development of LC-MS/MS confirmatory method for the determination of testosterone in bovine serum. **Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 81-89, mar. 2017.

ZHAN, J. *et al.* Multi-class method for determination of veterinary drug residues and other contaminants in infant formula by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, p. 827-834, jun. 2013.

ZHAO, H.; ZULKOSKI, J.; MASTOVSKA, K. Development and Validation of a Multiclass, Multiresidue Method for Veterinary Drug Analysis in Infant Formula and Related Ingredients Using UHPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 34, p. 7268-7287, ago. 2017.

ZORRAQUINO, M. A. *et al.* Heat treatment effects on the antimicrobial activity of macrolide and lincosamide antibiotics in milk. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 2, p. 311-315, fev. 2011.

ZUCHOWSKA, I. M.; WOZNIAK, B.; POSYNIAK, A. Comparison of the multiple reaction monitoring and enhance product ion scan modes for confirmation of stilbenes in bovine urine samples using LC-MS/MS QTRAP[®] System. **Chromatographia**, v. 79, p. 1003-1012, jul. 2016b.

ZUCHOWSKA, I. M.; WOZNIAK, B.; POSYNIAK, A. Determination of hormones residues in milk by gas chromatography-mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 727-739, ago. 2016a.