

Área: Ciência de Alimentos

PADRONIZAÇÃO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE RACTOPAMINA DE FARINHAS DE CARNE E OSSOS

Angélica Riqueli Laux*, Vanessa Gressler, Vivian Feddern

Laboratório de Análises Físico-Químicas, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

**E-mail: angelica.laux@hotmail.com*

RESUMO – A farinha de carne e ossos (FCO) pode substituir o farelo de soja, que é um dos ingredientes comumente empregados na dieta de suínos e aves, por também conter alto teor de proteína e minerais, além de ser de baixo custo. No entanto, esta farinha pode vir contaminada com ractopamina, que é um promotor de crescimento administrado na dieta de suínos nos 28 dias que antecedem o abate. Quando o período de retirada dessa substância não é respeitado, pode haver resíduos na urina e nos tecidos cárneos. Dessa forma é fundamental investigar a qualidade da FCO por meio da aplicação de métodos robustos, eficazes e práticos para evitar possíveis contaminações e/ou assegurar que os níveis de resíduos encontrados não tragam prejuízos ao consumidor e à cadeia produtiva. A metodologia de extração seguiu a técnica de QuEChERS utilizando Kit roQ™, seguida da etapa de *clean-up* da amostra, a qual foi posteriormente ressuspensa e injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas. Os resultados mostraram que a melhor solução extratora para resíduos de ractopamina em FCO utilizou acetonitrila/1% NH₄OH, com uma recuperação de 72,4%, a qual foi selecionada para os experimentos de avaliação da recuperação nas cinco concentrações selecionadas (200, 100, 50, 10 e 1 ng/g). Foi possível a obtenção de até 78,7% de recuperação com a metodologia desenvolvida neste trabalho. Os resultados são promissores, uma vez que com a metodologia proposta, uma ampla faixa de concentração de ractopamina pode ser monitorada.

Palavras-chave: Cromatografia líquida. Espectrômetro de Massas. Farinha de carne e ossos. QuEChERS.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil tem importante participação mundial na produção de grãos e proteínas de origem animal. Para a formulação da ração de aves e suínos, as principais matérias-primas são o milho e o farelo de soja, representando mais de 80% do volume da maioria das dietas e aproximadamente 65% do custo das formulações.

Devido à oscilação no preço da soja, a farinha de carne e ossos (FCO) pode ser uma alternativa proteica para compor a dieta de aves e suínos. Os nutrientes da FCO são compostos majoritariamente de proteína (35-

55%), minerais (36-48%), dos quais o cálcio compreende entre 13-17,5% e o fósforo de 5,5 a 7,5% (BELLAYER e LIMA, 2004). Segundo o Ministério da Agricultura da Pecuária e Abastecimento, a FCO não pode ser adicionada à dieta de bovinos, devido ao risco de encefalite espongiforme bovina, vulgarmente conhecida como “doença da vaca louca”. No entanto, não há legislação quanto sua utilização em rações para suínos e aves.

A ractopamina é um promotor de crescimento administrado na dieta de suínos em terminação (últimos 28 dias). Quando o período de retirada dessa substância não é respeitado pode haver resíduos acima do nível permitido na urina e nos tecidos cárneos (ATHAYDE et al., 2012). Conforme Pacheco (2008), aproximadamente 20% do suíno é destinado à produção de FCO, oriunda de diversas partes do animal cuja concentração de ractopamina é bastante variada (Dong et al., 2011) e/ou desconhecida. Nada ou pouco se sabe sobre concentrações de resíduos de ractopamina na farinha, e por consequência, nenhum controle sobre este resíduo é realizado antes de fazer a dosagem de ractopamina na ração contendo FCO, podendo levar a uma concentração superior à permitida pela legislação ou mesmo, em caso de fabricação de ração isenta de ractopamina, a FCO pode vir a ser uma fonte de contaminação.

A literatura mostra que a utilização de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada à Espectrometria de Massas (EM) é uma técnica bastante poderosa e amplamente utilizada para análise de resíduos de ractopamina em diversas matrizes. Para o preparo da amostra a ser injetada no cromatógrafo, é necessário realizar uma extração do composto a ser estudado. Para isto, a extração em fase sólida é uma das técnicas largamente utilizadas, inclusive para ractopamina (DONG et al., 2011; QIANG et al., 2007; KOOTSTRA et al., 2005). No entanto, ela demanda muito tempo de preparo para esta droga (cerca de quatro dias). Segundo Stubbings e Bigwood (2009), uma alternativa para diminuir o tempo de preparo da amostra incluindo o tempo de extração é o uso do kit QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). Com a utilização deste kit, pode-se reduzir o tempo de trabalho para aproximadamente 2,5 dias, pois é mais rápido e eficiente.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é desenvolver uma metodologia rápida e eficaz para determinação de resíduos de ractopamina em FCO, a fim de auxiliar na verificação de possíveis contaminações e/ou assegurar que os níveis de resíduos encontrados não tragam prejuízos ao consumidor e à cadeia produtiva.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Extração e *clean-up*

Amostras de $5 \pm 0,1$ g de FCO branco (FCO sem resíduo de ractopamina) foram pesadas em tubos tipo Falcon de 50 mL, fortificadas (*spike*) e agitadas manualmente por 1 min. Na sequência, foram adicionados 15 mL de tampão Tris (1M, pH 9,5) e 5 mg de protease com posterior agitação manual por 1 min. As amostras foram submetidas à digestão *overnight* em estufa a 60 °C. Após resfriar a temperatura ambiente, as amostras foram hidrolisadas com 45 µL de ácido acético, 3 mL de tampão acetato de amônio (2 M, pH 5,2) e aproximadamente 5.000 IU de enzima β-glucuronidase por 2 h a 65 °C (KOOTSTRA et al., 2005). Após a

hidrólise, a metodologia de extração seguiu a técnica de QuEChERS utilizando Kit roQTM (Phenomenex) e metodologia proposta pelo fabricante do Kit (EN 15662). Sendo assim, às amostras foram adicionados 10 mL da solução extratora e a mistura agitada manualmente por 1 min. Em seguida, foi adicionado o conteúdo do pacote de extração do Kit (4,0 g de sulfato de magnésio + 1,0 g de cloreto de sódio + 1,0 g de citrato de sódio tribásico diidratado + 0,5 g de citrato de sódio dibásico sesquidratado) seguido de agitação manual vigorosa por 1 min e centrifugação (5.000 g, 10 min). Foram transferidos 6 mL do sobrenadante para o tubo Falcon de 15 mL do Kit contendo 900 mg de sulfato de magnésio + 150 mg de C18 + 150 mg de PSA para realização da etapa de *clean-up* da amostra. A amostra foi agitada vigorosamente em vórtex por 1 min e centrifugada (5.000 g, 10 min). Adicionalmente à metodologia indicada pelo fabricante do Kit, uma etapa de concentração da amostra foi realizada, sendo assim, 2 mL do sobrenadante da etapa de *clean-up* foram evaporados sob N_{2(g)} a 55 °C. Por fim, as amostras foram ressuspendidas em 200 µL de metanol e transferidas para vials com *insert* e injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM). Os experimentos foram realizados em duplicata.

A etapa de extração foi testada com três soluções extratoras (acetonitrila, acetonitrila/1% ácido acético e acetonitrila/1% NH₄OH). A metodologia de extração acima foi testada para cinco concentrações (*spike*), 200 ng/g, 100 ng/g, 50 ng/g, 10 ng/g e 1 ng/g utilizando solução estoque de 2 µg/mL de padrão analítico de ractopamina em metanol.

Análise por LC-MS/MS

O sistema de análise utilizado consistiu em um cromatógrafo líquido Surveyor Plus acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo TSQ Quantum Access Max ambos da Thermo Scientific. A separação cromatográfica foi realizada em coluna ACE 5 C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) equilibrada a 30 °C. O volume de injeção da amostra foi de 10 µL. O gradiente de eluição utilizado consistiu de duas fases (eluente A, água Milli-Q com 0,1% de ácido fórmico e eluente B, metanol com 0,1% de ácido fórmico) com o seguinte sistema de eluição: 0-0,5 min isocrático 65% A e 35% B; 0,5-2,5 min gradiente até 100% de B; 2,5-5,0 min isocrático 100% B; 5,0-5,5 min gradiente até 65% A e 35% B; 5,5 – 10 min isocrático 65% A e 35% B, em um fluxo de 1,0 mL/min. A detecção foi realizada por electrospray com ionização no modo positivo. O espectrômetro de massas operou nas seguintes condições: voltagem do spray de 4.500 V, temperatura de vaporização de 300 °C, pressão de bainha de gás de 45 psi, pressão de gás auxiliar de 20 psi, temperatura do capilar de 305 °C e pressão do gás de colisão (argônio) de 1,7 mTorr. O modo de quantificação para os resíduos de ractopamina utilizado foi o *Selected Reaction Monitoring* (SRM). O íon precursor monitorado foi o *m/z* 302,2 e os íons filhos *m/z* 284,3, *m/z* 164,2 e *m/z* 107,2 com as respectivas energias de colisão: 9 V, 12 V e 30 V.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O delineamento da metodologia proposta neste trabalho para análise de resíduos de ractopamina em FCO reuniu basicamente (com adaptações) duas metodologias disponíveis. As primeiras etapas deste delineamento as quais envolveram digestão com protease e hidrólise com β -glucuronidase, foram inseridas na metodologia, uma vez que a FCO é uma matriz de origem cárnea, e segundo a literatura, o analito de interesse não se encontra em sua totalidade na forma livre e sim parcialmente conjugado (KOOTSTRA et al., 2005). As etapas seguintes seguiram a metodologia proposta pelo fabricante do Kit QuEChERS seguida de uma etapa de concentração. Esta etapa de concentração foi necessária devido à matriz de trabalho ser diferente das matrizes convencionais para QuEChERS (frutas e vegetais), aumentando assim a sensibilidade do método para FCO.

Os resultados mostraram que a melhor solução extratora para resíduos de ractopamina em FCO foi a acetonitrila/1% NH_4OH , com um percentual de recuperação de 72,4%. Enquanto que os resultados apresentados para as soluções extratoras acetonitrila e acetonitrila/1% ácido acético foram de 62,3 e 64,24%, respectivamente. Desta forma, a solução de acetonitrila/1% NH_4OH foi selecionada para os experimentos de avaliação da recuperação nas cinco concentrações selecionadas.

Devido ao fato de não se conhecer a provável concentração de resíduos de ractopamina em FCO, uma vez que inexistem referências que tratam desta problemática, optou-se por realizar ensaios de recuperação para cinco variadas concentrações (200 ng/g, 100 ng/g, 50 ng/g, 10 ng/g e 1 ng/g) com a finalidade de abranger um leque de possibilidades. Os resultados dos experimentos mostraram que para as cinco concentrações testadas, a metodologia proposta se mostra adequada para quantificação de ractopamina em amostras de FCO (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados de recuperação de ractopamina em FCO em diferentes concentrações utilizando acetonitrila/1% NH_4OH como solução extratora

| Concentração (ng/g) | % de Recuperação \pm DP |
|---------------------|---------------------------|
| 200 | 71,38 \pm 2,37 |
| 100 | 67,45 \pm 4,92 |
| 50 | 63,67 \pm 1,95 |
| 10 | 78,73 \pm 4,37 |
| 1 | 74,93 \pm 2,36 |

4. CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida neste trabalho para a determinação de ractopamina em FCO utilizando etapas de desconjugação (digestão e hidrólise) e posterior utilização de Kit QuEChERS com análise por LC-MS/MS é extremamente promissora, uma vez que uma ampla faixa de concentração de ractopamina pode ser

monitorada. Porém, experimentos adicionais de validação da metodologia são necessários para torná-la segura na quantificação de resíduos de ractopamina em FCO comerciais.

5. AGRADECIMENTOS

À FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina) e à EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- ATHAYDE, N. B.; DALLA COSTA, O. A.; ROÇA, R. O.; GUIDONI, A. L.; LUDTKE, C. B.; LIMA, G. J. J. Meat quality of swine supplemented with ractopamine under commercial conditions in Brazil. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 12, p. 4604-4610, 2012.
- BELLAVER, C.; LIMA, G. J. M. M. Pontos críticos para a utilização de proteínas e de gorduras de origem animal. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2004, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2004. p.71-94.
- PACHECO, J. W. **Guia técnico ambiental de graxarias**. São Paulo: CETESB, 2006. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/producao_limpa/documentos/graxaria.pdf>. Acesso em: 11 jul. 2013.
- DONG, Y.; XIA, X.; WANG, X.; DING, S.; LI, X.; ZHANG, S.; JIANG, H.; LIU, J.; LI, J.; FENG, Z.; YE, N.; ZHOU, M.; SHEN, J. Validation of an ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of ractopamine: Application to residue depletion study in swine. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 327-332, 2011.
- KOOTSTRA, P. R.; KUIJPERS, C. J. P. F.; WUBS, K. L.; VAN DOORN, D.; STERK, S. S.; VAN GINKEL, L. A.; STEPHANY, R. W. The analysis of beta-agonists in bovine muscle using molecular imprinted polymers with ion trap LCMS screening. **Analytica Chimica Acta**, v. 529, p. 75-81, 2005.
- STUBBINGS, G.; BIGWOOD, T. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, n. 1-2, p. 68-78, 2009.
- QIANG, Z.; SHENTU, F.; WANG, B.; WANG, J.; CHANG, J.; SHEN, J. Residue depletion of ractopamine and its metabolites in swine tissues, urine, and serum. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 4319-4326, 2007.