

## UTILIZAÇÃO DE SPE-LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RACTOPAMINA EM URINA DE SUÍNOS

Angélica Riqueli Laux<sup>1</sup>; Vivian Feddern<sup>2</sup>; Osmar Antonio Dalla Costa<sup>2</sup> e Vanessa Gressler<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduanda em Nutrição pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, estagiária da Embrapa Suínos e Aves, e-mail: angelica.laux@hotmail.com

<sup>2</sup>Pesquisador(a) da Embrapa Suínos e Aves

<sup>3</sup>Analista da Embrapa Suínos e Aves

**Palavras-chave:** extração em fase sólida, cromatografia líquida, espectrometria de massas, resíduo de ractopamina, urina.

### INTRODUÇÃO

A ractopamina é um agonista  $\beta$ -adrenérgico de uso controlado em muitos países, incluindo o Brasil. Este aditivo é adicionado em rações para promover o aumento da deposição de carne e a redução do total de gordura na carcaça (1,2). No Brasil, o MAPA permite a utilização exclusiva da ractopamina em rações para suínos em fase de terminação em doses de 5-20 mg/kg (1) e segundo a FAO (2), os limites máximos permitidos de resíduos de ractopamina em suínos são de 10  $\mu$ g/kg para músculo, 40  $\mu$ g/kg para fígado, 90  $\mu$ g/kg para rim e 90  $\mu$ g/L para urina. Uma vez que esta substância possui restrições no mercado, é de extrema importância seu monitoramento. Sendo assim, torna-se necessário o desenvolvimento e implantação de metodologias de detecção desta substância para assegurar que os produtos destinados ao consumidor sejam seguros, ou seja, dentro das especificações impostas pelos órgãos regulamentadores. Desta forma, o presente trabalho visa implantar uma metodologia otimizada para análise de resíduos de ractopamina em urina de suínos por extração em fase sólida (SPE) e determinação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

### MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de 5 mL de urina branco (sem resíduo de ractopamina) foram pipetados em tubos tipo Falcon de 15 mL, fortificadas (spike) e agitadas em vortex por 1 min. Na sequência, as amostras foram hidrolisadas com aproximadamente 5.000 IU de enzima  $\beta$ -glicuronidase por 2 h a 65 °C (3). Após os pHs das amostras foram ajustados para 6-7, seguido de centrifugação (5.000 g, por 10 min). A extração em fase sólida foi realizada utilizando cartucho SupelMIP (25 mg/10 mL, Supelco) da seguinte forma: condicionamento com 1 mL de metanol, 1 mL de água Milli-Q e 1 mL de acetato de amônio 25 mM (pH 6,7); aplicação da amostra seguido de 2 min de vácuo; lavagem do cartucho com 1 mL de água Milli-Q, vácuo por 2 min, 1 mL de acetonitrila com 1% de ácido acético, 1 mL acetato de amônio 50 mM (pH 6,7), 1 mL da solução de 60% acetonitrila/40% água Milli-Q e vácuo por 2 min; eluição com 2 x de 1 mL de metanol com 10% de ácido acético (4). As amostras foram secas em N<sub>2</sub>(g), ressuspensas em 1 mL de metanol/água 1:1 e injetadas no LC-MS/MS. Os experimentos foram realizados em triplicata. 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  $\mu$ m) equipada com coluna guarda C18 e equilibrada a 30 °C. O volume de injeção da amostra foi de 10  $\mu$ L. 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.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 apresenta os resultados de recuperação de amostras de urina dopadas (Spike) com ractopamina em diversas concentrações usando LC-MS/MS.

Outros parâmetros de validação também foram verificados, como os limites de detecção (LOD), de quantificação (LOQ) e linearidade. Os LOD e LOQ foram determinados pelo método visual, sendo que o LOD foi expresso através do estabelecimento do nível mínimo ao qual a substância pode ser detectada com segurança e o LOQ três vezes o LOD. Os limites encontrados foram de 0,01 ng/mL para LOD e 0,03 ng/mL para LOQ. A linearidade do método foi obtida da curva de calibração com treze pontos no intervalo de 0 a 250 ng/mL ( $R^2 = 0,9932$ ).

## CONCLUSÕES

O método aplicado para análise de ractopamina em urina mostrou-se bastante eficiente, com taxas de recuperação superiores a 70% e com limites de detecção e quantificação extremamente baixos, possibilitando a identificação e quantificação de resíduos abaixo do limite estabelecido pela FAO (2) que é de 90 ng/mL. Além disso, o método mostrou-se relativamente rápido, com um preparo de amostras de aproximadamente 6 horas, tornando-o viável para implantação em laboratórios de análises de rotina.

## AGRADECIMENTOS

FAPESC – Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina.

## REFERÊNCIAS

1. MAPA Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - **Antimicrobianos anticoccidianos e agonistas autorizados DFIP** - dezembro 2008. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/animal/alimentacao>> Acesso em: 03 fev. 2011.
2. FAO. **UN food safety body sets limits on veterinary growth promoting drug**. Codex Alimentarius Commission adopts maximum residue levels. 06 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/news/story/en/item/150953/icode/>>. Acesso em: 25 jul. 2012.
3. 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.
4. HEEMKEN, O.; WHILBORG, A.-K. **Comparison of SupelMIP™ SPE – Beta-agonists and Mixed-mode SPE for the extraction of beta-agonists from urine samples**. Supelco Analytical Report. v. 26.4, p. 13-15, 2008. Disponível em: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/The\\_Reporter/t208004.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/The_Reporter/t208004.pdf). Acesso em: 04 set. 2013

Tabela 1. Recuperação de ractopamina de amostras de urina contaminadas utilizando LC-MS/MS.

Spike (ng/g)	Recuperação (%)
10	70,19
50	74,36
100	78,71
150	72,79