UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e validação de métodos para análise de
Ractopamina na matéria-prima, no produto Ractosuin[®],
no complexo vitamínico-mineral e na ração
para suínos em terminação

Ellen Figueiredo Freire

Ribeirão Preto

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e validação de métodos para análise de
Ractopamina na matéria-prima, no produto Ractosuin[®],
no complexo vitamínico-mineral e na ração
para suínos em terminação

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a
obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Ellen Figueiredo Freire

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani

Ribeirão Preto
2010

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE**

Freire, Ellen Figueiredo

Desenvolvimento e validação de métodos para análise de Ractopamina na matéria-prima, no produto Ractosuin[®], no complexo vitamínico-mineral e na ração para suínos em terminação Ribeirão Preto, 2010

98 p.: 30 cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: de Gaitani, Cristiane Masetto.

1. Ractopamina. 2. matéria-prima. 3. Ractosuin[®]. 4. complexo vitamínico-mineral. 5. ração.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Ellen Figueiredo Freire

Título: Desenvolvimento e validação de métodos para análise de Ractopamina na matéria-prima, no produto Ractosuin[®], no complexo vitamínico-mineral e na ração para suínos em terminação

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIAS

É com muito amor, respeito e admiração que dedico este trabalho:

Aos meus pais, **Ercio e Leninha**, pelo incentivo e apoio incondicional ao longo dos anos.

Aos meus irmãos **Erik e Denys**, que tanto me alegram pela presença e carinho.

E ao **Keyller**, pelo amor, compreensão e ajuda.

Ofereço ainda, minha eterna gratidão à **Profa. Dra. Cristiane**, pela dedicação e paciência na orientação deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, que nos faz acreditar nos momentos difíceis e nos dá saúde e força para seguir em frente.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências** pela enorme contribuição na minha formação.

À **Ourofino Agronegócio**, pelo apoio durante a realização desta pesquisa.

Aos **Colegas da Pós- Graduação e da Indústria**, pela amizade proporcionada nesta etapa da vida.

À **Raquel** e à **Lucimara**, por colaborarem comigo neste trabalho.

À **todos** que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

“Se és incapaz de sonhar, nasceste velho; se teu sonho te impede de agir conforme a realidade, nasceste inútil; se, porém, sabes transformar sonhos em realidade e tocar a realidade com a luz do teu sonho, então serás grande no teu mundo, e o mundo será grande em ti.”

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS	VI
INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. RACTOPAMINA (RAC)	4
1.1.1. Farmacodinâmica	6
1.1.2. Farmacocinética	7
1.1.3. Biotransformação	8
1.1.4. Análise da RAC	9
1.1.5. Limite máximo de resíduos para a Ractopamina	11
OBJETIVOS GERAIS	12
CAPÍTULO 1: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA ANÁLISE DE RACTOPAMINA NA MATÉRIA-PRIMA E NO PRODUTO RACTOSUIN®	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. MATERIAL	18
3.1.1. Reagentes e solventes empregados no procedimento analítico	18
3.1.2. Soluções-padrão	18
3.1.3. Equipamentos	18
3.2. MÉTODOS	19
3.2.1. Otimização das condições cromatográficas para a análise de RAC	19
3.2.2. Procedimento de preparação da amostra da matéria-prima e do Ractosuin®	20
3.2.3. Validação do método analítico	21
3.2.3.1. SYSTEM SUITABILITY	21
3.2.3.2. ESTUDO DE SELETIVIDADE	21
3.2.3.3. LINEARIDADE	22
3.2.3.4. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)	23
3.2.3.5. PRECISÃO E EXATIDÃO	24
3.2.3.6. ESTUDO DE ESTABILIDADE	25
3.2.3.7. ESTUDO DE ROBUSTEZ	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA ANÁLISE DA RAC	27
4.1.1. Determinação do comprimento de onda para detecção	27
4.1.2. Otimização das condições cromatográficas para a análise da RAC	27
4.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DESENVOLVIDO	30
4.2.1. System suitability	30
4.2.2.1. Estudo de seletividade	31
4.2.3. Linearidade	33
4.2.4. Limite de detecção e quantificação	35
4.2.5. Precisão e exatidão	35
4.2.5.1. PRECISÃO INTRA E INTERENSAIOS	35
4.2.5.2. EXATIDÃO INTRA E INTERENSAIOS	36
4.2.6. Estudo de estabilidade	38
4.2.7. Estudo de robustez	38
4.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO	39
5. CONCLUSÕES	41
CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA ANÁLISE DE RACTOPAMINA NO COMPLEXO VITAMÍNICO-MINERAL	42
1. INTRODUÇÃO	43
2. OBJETIVOS	45
3. MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1. MATERIAL	46
3.1.1. Reagentes e solventes empregados no procedimento analítico	46
3.1.2. Soluções-padrão	46
3.1.3. Equipamentos	46
3.2. MÉTODOS	47
3.2.1. Avaliação das condições cromatográficas para análise de RAC	47

3.2.2.	Procedimento de preparação da amostra do complexo vitamínico- mineral.....	47
3.2.3.	Validação do método analítico.....	48
3.2.3.1.	SYSTEM SUITABILITY.....	48
3.2.3.2.	ESTUDO DE SELETIVIDADE.....	48
3.2.3.3.	LINEARIDADE.....	48
3.2.3.4.	LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	49
3.2.3.5.	PRECISÃO E EXATIDÃO.....	49
3.2.3.6.	RECUPERAÇÃO.....	51
3.2.3.7.	ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	53
3.2.3.8.	ESTUDO DE ROBUSTEZ.....	53
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1.	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA ANÁLISE DA RAC.....	55
4.2.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DESENVOLVIDO.....	58
4.2.1.	System suitability.....	58
4.2.2.	Estudo de seletividade.....	58
4.2.3.	Linearidade.....	60
4.2.4.	Limite de detecção e quantificação.....	60
4.2.5.	Precisão e exatidão.....	60
4.2.6.	Recuperação.....	62
4.2.7.	Estudo de estabilidade.....	62
4.2.8.	Estudo de robustez.....	63
4.3.	APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	65
5.	CONCLUSÕES.....	66
 CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA ANÁLISE DE RACTOPAMINA NA RAÇÃO.....		
67		
1.	INTRODUÇÃO.....	68
2.	OBJETIVOS.....	69
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	70
3.1.	MATERIAL.....	70
3.1.1.	Reagentes e solventes empregados no procedimento analítico.....	70
3.1.2.	Soluções-padrão.....	70
3.1.3.	Equipamentos.....	70
3.2.	MÉTODOS.....	71
3.2.1.	Otimização das condições cromatográficas para a análise de RAC.....	71
3.2.2.	Procedimento de preparação da amostra da ração.....	71
3.2.3.	Validação do método analítico.....	72
3.2.3.1.	SYSTEM SUITABILITY.....	72
3.2.3.2.	ESTUDO DE SELETIVIDADE.....	72
3.2.3.3.	LINEARIDADE.....	73
3.2.3.4.	LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	73
3.2.3.5.	PRECISÃO E EXATIDÃO.....	74
3.2.3.6.	RECUPERAÇÃO.....	74
3.2.3.7.	ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	76
3.2.3.8.	ESTUDO DE ROBUSTEZ.....	76
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
4.1.	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA ANÁLISE DA RAC.....	77
4.2.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DESENVOLVIDO.....	80
4.2.1.	System suitability.....	80
4.2.2.	Estudo de seletividade.....	80
4.2.3.	Linearidade.....	82
4.2.4.	Limite de detecção e quantificação.....	83
4.2.5.	Precisão e exatidão.....	83
4.2.6.	Recuperação.....	84
4.2.7.	Estudo de estabilidade.....	85
4.2.8.	Estudo de robustez.....	85
4.3.	APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	87
5.	CONCLUSÕES.....	88
CONCLUSÕES GERAIS.....		89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		91

RESUMO

FREIRE, E. F. **Desenvolvimento e validação de métodos para análise de Ractopamina na matéria-prima, no produto Ractosuin[®], no complexo vitamínico-mineral e na ração para suínos em terminação.** 2010. 98f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Muitos fármacos, principalmente os agonistas β -adrenérgicos, vêm sendo utilizados na produção animal e, devido às novas formas de pecuária intensiva, sua utilização tem crescido exponencialmente. Dentre os agonistas β -adrenérgicos, a Ractopamina (RAC) é o mais utilizado como agente repartidor de nutrientes, pois promove ganho de peso, eficiência alimentar, deposição de tecido muscular e rendimento da carcaça de suínos, bovinos, ovinos e perus. Neste contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectar e quantificar a RAC na matéria-prima, no produto acabado, em pré-formulações enriquecidas com nutrientes e minerais e na ração é de suma importância no controle de qualidade do produto acabado comercializado por indústrias veterinárias, visando maior segurança para os animais e para o consumidor de carnes. Desta forma, este projeto tem como objetivo desenvolver e validar métodos analíticos capazes de quantificar o fármaco nestas 4 etapas (matéria-prima, produto acabado Ractosuin[®], pré-mistura com complexo vitamínico-mineral e na mistura destes componentes com a ração). No primeiro capítulo deste trabalho está descrito o método para quantificação da RAC na matéria-prima e no produto acabado Ractosuin[®]. Este método apresentou-se linear no intervalo de concentração de 160,00 a 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r \geq 0,99$). Os coeficientes de variação nos estudos de precisão intra e interensaios foram inferiores a 2,0% e a exatidão intra e interensaios variaram de 97 a 100%. No segundo capítulo, foi utilizada a extração líquido-líquido e acetato de etila como solvente extrator para a análise da RAC no complexo vitamínico-mineral. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de 90,00 a 210,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r \geq 0,99$). Os coeficientes de variação nos estudos de precisão intra e interensaios foram inferiores a 1,5%, a exatidão intra e interensaios variaram de 98 a 102% e a recuperação ficou em torno de 94%. O terceiro capítulo mostra o método desenvolvido e validado para análise da RAC na ração. A RAC foi extraída da matriz utilizando a extração líquido-líquido com acetato de etila. A curva analítica apresentou-se linear no intervalo de concentração de 6,50 a 14,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r \geq 0,99$), o limite de detecção (LD) foi de 2,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o limite de quantificação (LQ) foi de 4,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os coeficientes de variação nos estudos de precisão intra e interensaios foram inferiores a 5,0%, a exatidão intra e interensaios variaram de 90 a 98% e a recuperação foi de 84%. Desta forma, os métodos desenvolvidos e validados podem ser aplicados em análises de rotina de controle de qualidade de indústrias veterinárias para a quantificação da RAC na matéria-prima, no produto acabado Ractosuin[®], no complexo vitamínico-mineral e na ração.

Palavras chave: ractopamina, controle de qualidade, CLAE, matéria-prima, Ractosuin[®], complexo vitamínico-mineral, ração.

ABSTRACT

FREIRE, E. F. **Development and validation of methods for analysis of ractopamine in raw material, feed additive Ractosuin[®], vitamin-mineral complex and ration for swine in termination.** 2010. 98f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Several drugs, especially β -adrenergic agonists, have been used in animal production and due to new forms of intensive livestock their use has grown exponentially. Among the β -adrenergic agonists, ractopamine (RAC) is the most used as a nutrient repartitioning agent, it promotes weight gain, feed efficiency, deposition of muscle and carcass yield of pigs, cattle, sheep and turkeys. In this context, the development of analytical methods able to detect and quantify RAC in the raw material, feed additive, in pre-formulation (feed additive) enriched with nutrients and minerals and in the ration is very important in quality control of pharmaceutical formulation marketed by veterinary industries for greater security for animals and to consumers of meat. Thus, this project aims to develop and validate analytical methods able to quantify the drug in these 4 stages (raw material, feed additive Ractosuin[®], pre-mixed with vitamin mineral complex and the mixture of these components with the ration). In the first chapter of this work is described the method for quantification of RAC in the raw material and feed additive Ractosuin[®]. This method showed linearity over the concentration range from 160.00 to 240.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r \geq 0.99$). The coefficients of variation in studies of intra-and interassay precision were less than 2,0% and intra and interassay accuracy ranged from 97 to 100%. In the second chapter, we used liquid-liquid extraction and ethyl acetate as solvent extractor for the analysis of RAC in complex vitamin-mineral. The calibration curve was linear over the concentration range from 90.00 to 210.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r \geq 0.99$). The coefficients of variation in studies of intra and interassay precision were less than 1.5%, intra and interassay precision varied from 98 to 102% and the recovery was around 94%. The third chapter shows the method developed and validated for analysis of RAC in the ration. The RAC was extracted from the matrix by liquid-liquid extraction with ethyl acetate. The analytical curve was linear over the concentration range 6.50 to 14.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r \geq 0.99$), the limit of detection (LD) was 2.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and limit of quantification (LQ) was 4.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The coefficients of variation in studies of intra and interassay precision were less than 5.0%, intra and interassay accuracy ranged from 90 to 98% and the recovery was 84%. Thus, the methods developed and validated can be applied in routine analysis for quality control of veterinary industries for the quantification of RAC in the raw material, feed additive Ractosuin[®], vitamin mineral complex and in the ration.

Keywords: ractopamine, control quality, HPLC, raw material, Ractosuin[®], vitamin mineral complex, ration.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	fator de separação
CE	eletroforese capilar
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CV	coeficiente de variação
E(%)	Exatidão
ELL	extração líquido-líquido
FDA	Food and Drug Administration
GC	cromatografia gasosa
k	fator de retenção
N	número de pratos teóricos
n	número de amostras
p.a.	padrão analítico
PLAC 1	placebo utilizado na validação do Ractosuín®
PLAC 2	placebo utilizado na validação do Complexo vitamínico-mineral
PLAC 3	placebo utilizado na validação da Ração
r	coeficiente de correlação linear
r ²	coeficiente de determinação
R _s	Resolução
R(%)	Recuperação
RAC	cloridrato de ractopamina
UPLC	ultra performance liquid chromatography

LISTA DE FIGURAS

FIGURA IG-1	Quantidade de RAC presente em cada etapa de análise até chegar aos suínos.	4
FIGURA IG-2	Estrutura molecular dos estereoisômeros da ractopamina (RAC).	5
FIGURA IG-3	Estrutura molecular de alguns agonistas β -adrenérgicos.	6
FIGURA IG-4	Mecanismo de ação dos β -agonistas adrenérgicos. Sendo: RAC: Ractopamina, Rec: receptor, GDP: guanosina difosfato; GTP: guanosina trifosfato; Ge: proteína G estimulatória, Ge α : proteína G estimulatória subunidade α , AC: adenilato ciclase, AMPc: adenosina 3',5'- monofosfato cíclico, PQ: proteína quinase (Modificado de LEHNINGER; NELSON; COX, 2004).	7
FIGURA IG-5	Estrutura molecular dos metabólitos da Ractopamina (RAC) em suínos, cães e ratos.	8
FIGURA C1-1	Espectros de absorção na região UV da RAC em fase móvel na concentração de 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.	27
FIGURA C1-2	Cromatograma referente à matéria-prima de RAC. Condições cromatográficas: coluna C8 Waters Co [®] (250 mm x 4,6 mm x 5 μm); coluna de guarda C8 Waters Co [®] (4,0 mm x 3,0 mm x 5 μm); fase móvel: tampão acetato de sódio 0,100 mol L ⁻¹ pH 5,0: acetonitrila (75: 25, v/v); vazão de 1,0 mL min ⁻¹ ; forno da coluna a 25 °C e detecção 275 nm.	29
FIGURA C1-3	Cromatograma referente ao produto acabado Ractosuin [®] . Condições cromatográficas: coluna C8 Waters Co [®] (250 mm x 4,6 mm x 5 μm); coluna de guarda C8 Waters Co [®] (4,0 mm x 3,0 mm x 5 μm); fase móvel: tampão acetato de sódio 0,100 mol L ⁻¹ pH 5,0: acetonitrila (75: 25, v/v); vazão de 1,0 mL min ⁻¹ ; forno da coluna a 25 °C e detecção 275 nm.	30
FIGURA C1-4	Cromatogramas referentes à fase móvel (A) e ao PLAC 1 (B). Condições cromatográficas: coluna C8 Waters Co [®] (250 mm x 4,6 mm x 5 μm); coluna de guarda C8 Waters Co [®] (4,0 mm x 3,0 mm x 5 μm); fase móvel: tampão acetato de sódio 0,100 mol L ⁻¹ pH 5,0: acetonitrila (25: 75, v/v); vazão de 1,0 mL min ⁻¹ ; forno da coluna a 25 °C e detecção 275 nm.	32
FIGURA C1-5	Cromatograma referente à separação da RAC no produto Ractosuin [®] e seus interferentes adjacentes. (1) Interferente A, (2) RAC e (3) Interferente B. Condições cromatográficas: coluna C8 Waters Co [®] (250 mm x 4,6 mm x 5 μm); coluna de guarda C8 Waters Co [®] (4,0 mm x 3,0 mm x 5 μm); fase móvel: tampão acetato de sódio 0,100 mol L ⁻¹ pH 5,0: acetonitrila (25: 75, v/v); vazão de 1,0 mL min ⁻¹ ; forno da coluna a 25 °C e detecção 275 nm.	32
FIGURA C1-6	((A) Curva analítica demonstrando o coeficiente de determinação e de correlação para RAC na matéria-prima no intervalo de concentração de 160,00 a 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtida no 1° dia de validação. (B) Curva analítica demonstrando o coeficiente de determinação e de correlação para RAC na matéria-prima no intervalo de concentração de 160,00 a 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtida no 2° dia de validação.	34
FIGURA C1-7	(A) Curva analítica demonstrando o coeficiente de determinação e de correlação para o PLAC 1 fortificado com RAC no intervalo de concentração de 160,00 a 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtida no 1° dia de validação. (B) Curva analítica demonstrando o coeficiente de determinação e de correlação para o placebo fortificado com RAC no intervalo de concentração de 160,00 a 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtida no 2° dia de validação.	34
FIGURA C2-1	Esquema do procedimento empregado para a realização do teste de recuperação: adição das soluções-padrão depois da partição (concentrações reais).	52
FIGURA C2-2	Esquema do procedimento empregado para a realização do teste de recuperação: adição das soluções-padrão antes da partição (concentrações obtidas).	52

FIGURA C2-3	Cromatograma referente ao padrão de RAC adicionado ao PLAC 2. Condições cromatográficas: coluna C18 Phenomenex® Gemini (250 mm x 4,6 mm x 5 µm); coluna de guarda C18 Phenomenex® (4,0 mm x 3,0 mm x 5 µm); fase móvel: tampão fosfato de sódio monobásico anidro 0,100 mol L ⁻¹ pH 7,6; acetonitrila (74: 26, v/v); vazão de 1,1 mL min ⁻¹ ; temperatura da coluna a 40 °C e detecção em 275 nm.	57
FIGURA C2-4	Cromatograma referente ao PLAC 2. Condições cromatográficas: coluna C18 Phenomenex® Gemini (250 mm x 4,6 mm x 5 µm); coluna de guarda C18 Phenomenex® (4,0 mm x 3,0 mm x 5 µm); fase móvel: tampão fosfato de sódio monobásico anidro 0,100 mol L ⁻¹ pH 7,6; acetonitrila (74: 26, v/v); vazão de 1,1 mL min ⁻¹ ; temperatura da coluna a 40 °C e detecção em 275 nm.	57
FIGURA C2-5	Cromatograma referente à separação da RAC no complexo vitamínico-mineral acrescido de Ractosuin® e seu interferente adjacente. (1) RAC e (2) Interferente A. Condições cromatográficas: coluna C18 Phenomenex® Gemini (250 mm x 4,6 mm x 5 µm); coluna de guarda C18 Phenomenex® (4,0 mm x 3,0 mm x 5 µm); fase móvel: tampão fosfato de sódio monobásico anidro 0,100 mol L ⁻¹ pH 7,6; acetonitrila (74: 26, v/v); vazão de 1,1 mL min ⁻¹ ; temperatura da coluna a 40 °C e detecção em 275 nm.	59
FIGURA C2-6	Curva analítica demonstrando o coeficiente de determinação e de correlação para o PLAC 2 fortificado com RAC no intervalo de concentração de 90,00 a 210,00 µg mL ⁻¹ .	60
FIGURA C3-1	Esquema do procedimento empregado para a realização do teste de recuperação: adição das soluções-padrão depois da partição (concentrações reais).	75
FIGURA C3-2	Esquema do procedimento empregado para a realização do teste de recuperação: adição das soluções-padrão antes da partição (concentrações obtidas)	75
FIGURA C3-3	Cromatograma referente ao padrão de RAC adicionado ao PLAC 3. Condições cromatográficas: coluna C18 Phenomenex® Gemini (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), coluna de guarda C18 Phenomenex® (4,0 mm x 3,0 mm x 5 µm); fase móvel: tampão formiato de amônio 0,02 mol L ⁻¹ pH 3,0; acetonitrila (80: 20, v/v); vazão de 1,1 mL min ⁻¹ e detecção em 223 nm.	79
FIGURA C3-4	Cromatograma referente ao PLAC 3. Condições cromatográficas: coluna C18 Phenomenex® Gemini (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), coluna de guarda C18 Phenomenex® (4,0 mm x 3,0 mm x 5 µm); fase móvel: tampão formiato de amônio 0,02 mol L ⁻¹ pH 3,0; acetonitrila (80: 20, v/v); vazão de 1,1 mL min ⁻¹ e detecção em 223 nm.	79
FIGURA C3-5	Cromatograma referente à separação da RAC na ração e seus interferentes adjacentes. (1) Interferente A, (2) RAC e (3) Interferente B. Condições cromatográficas: coluna C18 Phenomenex® Gemini (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), coluna de guarda C18 Phenomenex® (4,0 mm x 3,0 mm x 5 µm); fase móvel: tampão formiato de amônio 0,02 mol L ⁻¹ pH 3,0; acetonitrila (80: 20, v/v); vazão de 1,1 mL min ⁻¹ e detecção em 223 nm.	81
FIGURA C3-6	Curva analítica demonstrando o coeficiente de determinação e de correlação para o PLAC 3 fortificado com RAC no intervalo de concentração de 6,50 a 14,40 µg mL ⁻¹ .	82

LISTA DE TABELAS

TABELA IG-1	Métodos para a análise da RAC encontrados na literatura.	10
TABELA IG-2	Limite máximo de resíduos (LMR) para a RAC em tecidos de bovinos e suínos.	11
TABELA C1-1	Composição do produto Ractosuin [®] .	16
TABELA C1-2	Concentração final dos padrões de RAC na validação da matéria-prima.	22
TABELA C1-3	Concentração final dos padrões de RAC na validação do produto Ractosuin [®] .	23
TABELA C1-4	Condições cromatográficas para determinação de RAC na matéria-prima e no Ractosuin [®] .	29
TABELA C1-5	Resultados do <i>system suitability</i> da RAC na validação do método da matéria-prima e do Ractosuin [®] .	31
TABELA C1-6	Parâmetros cromatográficos obtidos para a RAC na matéria-prima e no Ractosuin [®] .	33
TABELA C1-7	Limite de detecção e quantificação do método validado ^a de análise da RAC.	35
TABELA C1-8	Precisão do método para análise da RAC na matéria-prima.	36
TABELA C1-9	Precisão do método para análise da RAC no produto acabado.	36
TABELA C1-10	Exatidão do método para análise da RAC na matéria-prima.	37
TABELA C1-11	Exatidão do método para análise da RAC no produto acabado.	37
TABELA C1-12	Teste de estabilidade da RAC na matéria-prima e no produto Ractosuin [®] .	38
TABELA C1-13	Condições cromatográficas e valores encontrados durante o estudo de robustez.	39
TABELA C1-14	Determinação de RAC em amostras de matéria-prima e produto acabado.	40
TABELA C2-1	Constituição do complexo vitamínico-mineral.	43
TABELA C2-2	Concentração final dos padrões de RAC na validação do complexo vitamínico-mineral.	49
TABELA C2-3	Condições cromatográficas para determinação de RAC no complexo de vitaminas e minerais.	56
TABELA C2-4	Resultados do <i>system suitability</i> da RAC na validação do complexo vitamínico-mineral.	58
TABELA C2-5	Parâmetros cromatográficos obtidos para a RAC no complexo de vitaminas e minerais.	59
TABELA C2-6	Precisão do método para análise da RAC no complexo vitamínico-mineral.	61
TABELA C2-7	Exatidão do método analítico validado para análise da RAC no complexo vitamínico-mineral.	61
TABELA C2-8	Recuperação (R%) do método de análise da RAC no complexo vitamínico-mineral.	62
TABELA C2-9	Teste de estabilidade da RAC no complexo vitamínico-mineral.	63
TABELA C2-10	Parâmetros experimentais e valores de respostas para a robustez do método do complexo vitamínico-mineral usando <i>Box-Behnken Design</i> .	64
TABELA C2-11	Coeficientes de regressão e valores de probabilidade associados (<i>p</i> -value) para a resposta das concentrações da solução padrão de RAC e da amostra de complexo vitamínico-mineral.	64
TABELA C2-12	Determinação de RAC em amostras de complexo vitamínico-mineral.	65
TABELA C3-1	Concentração final dos padrões de RAC na validação da ração.	73
TABELA C3-2	Condições cromatográficas para determinação de RAC na ração.	78
TABELA C3-3	Resultados do <i>system suitability</i> da RAC na validação da ração.	80
TABELA C3-4	Parâmetros cromatográficos obtidos para a RAC na ração.	82
TABELA C3-5	Precisão do método para análise da RAC na ração.	83
TABELA C3-6	Exatidão do método analítico validado para análise da RAC na ração.	84
TABELA C3-7	Recuperação (R%) do método de análise da RAC na ração.	84
TABELA C3-8	Teste de estabilidade da RAC na ração.	85
TABELA C3-9	Parâmetros experimentais e valores de respostas para a robustez do método da ração usando <i>Box-Behnken Design</i> .	86
TABELA C3-10	Coeficientes de regressão e valores de probabilidade associados (<i>p</i> -value) para a resposta das concentrações da solução padrão de RAC e da amostra de ração.	86
TABELA C3-11	Determinação de RAC em amostras de ração.	87

Introdução Geral

1. INTRODUÇÃO GERAL

A quantidade de fármacos utilizada na produção animal tem crescido exponencialmente, sobretudo devido às novas formas de pecuária intensiva. O uso desses fármacos como promotores do crescimento, e dos agonistas β -adrenérgicos, em especial, levanta um conjunto de preocupações relacionadas com a sua segurança/toxicidade quanto à presença dos seus resíduos na carne e vísceras dos animais. Em 1988, o uso de agonistas β -adrenérgicos, anteriormente autorizados como antiasmáticos e bronco-dilatadores para uso humano e veterinário, começou a ser largamente usado como agente de repartição, pois interferem no metabolismo de suínos desviando nutrientes e proporcionando melhora significativa no desempenho e nas características de carcaças de suínos em terminação, por aumentar a taxa de deposição e a eficiência do tecido muscular (WATKINS et al., 1990; DOS RAMOS, 2000; SCHINKEL et al., 2003). Em geral, a ação dos agentes de repartição promove ganho de peso, eficiência alimentar, deposição de tecido muscular e rendimento da carcaça de suínos, bovinos, ovinos e perus, enquanto essas vantagens para os frangos são menos intensas (MOODY; HANCOCK; ANDERSON, 2000; ASATO et al., 1984; MERSMANN, 1987; HANRAHN, 1987; INKSTER et al., 1989).

A carne suína é a mais consumida no mundo, representando 39% do consumo total de carne pela população mundial. Atualmente, a produção mundial é de 83.608 milhões de toneladas por ano. Esse fato está principalmente relacionado ao alto consumo per capita na China e Europa por questões culturais. O Brasil ocupa a 4ª posição do ranking, com produção de 2.885 mil toneladas de carne suína e 36 milhões de cabeças abatidas por ano, estimando-se que cerca de 700 mil pessoas dependam diretamente da cadeia produtiva da suinocultura brasileira, tendo um valor estimado em U\$ 1,6 bilhões (PORKWORLD, 2008).

Neste contexto, o aumento do peso da carcaça é uma maneira de aumentar o volume e a eficiência do processo de produção de suínos, onde os custos por unidade de peso podem ser reduzidos significativamente. No entanto, a produção de suínos mais pesados está associada a um aumento na deposição de gordura e uma redução na eficiência alimentar.

Desta forma, o uso de Ractopamina (RAC) como aditivo na ração, aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no Brasil, é uma excelente alternativa para potencializar a produção de carne e beneficiar a

cadeia produtiva de suínos. O uso da RAC é permitido na produção suína dos Estados Unidos, Brasil e outros 21 países, mas é banido na China e em outros 159 países devido a preocupações com a saúde. Segundo a *Codex Alimentarius*, órgão internacional que estabelece os padrões de qualidade dos alimentos, várias pesquisas científicas foram realizadas para estabelecer o impacto dessa substância na saúde dos consumidores e não foram encontradas provas de um efeito negativo no ser humano se utilizada de forma controlada (PORKWORLD, 2008).

Vários estudos realizados sugerem que a RAC seja administrada na dieta do suíno nos 28 dias que antecedem ao abate. Esse período corresponde à fase de engorda que normalmente é caracterizada por um aumento na deposição de gordura e redução na conversão alimentar do animal.

Alguns repartidores de nutrientes podem alterar as exigências de nutrientes dos suínos (ANDERSON; VEENHUIZEN; WAITT, 1987). Os níveis de aminoácidos, necessários para maximizar o desempenho, devem ser aumentados ao suplementar β -agonistas na dieta de suínos (BARK et al., 1992).

Dessa forma, para obter uma resposta ideal ao uso desse aditivo repartidor de nutrientes, é necessário disponibilizar na ração níveis adequados de vários aminoácidos, entre eles a lisina (0,90-1,20%) e de proteína (mínimo 16% de proteína bruta), para sustentar o maior ganho em peso de carne (SCHINCKEL et al., 2003).

A característica que diferencia a RAC de qualquer outro aditivo de rações para suínos é que este componente direciona os nutrientes da dieta para um aumento da quantidade de carne magra de qualidade em vez de serem utilizados para a deposição de gordura.

As conseqüências negativas da utilização da RAC em suínos em terminação são a hiperatividade e dificuldades no transporte e manuseio dos animais. Este princípio ativo também proporciona mudanças fisiológicas nos suínos, aumentando a frequência cardíaca e o nível das catecolaminas, os quais são indicativos de stress (MARCHANT-FORDE et al., 2003).

A RAC é a única substância de sua classe que recebeu a autorização do FDA para uso nas rações para suínos. Em maio de 2006, o FDA aprovou a administração de 5 a 10 ppm por dia de RAC aos suínos, o que possibilita um ganho de peso de 20,4 a 40,8 Kg antes do abate (CARR et al., 2009). A RAC possui fraca afinidade por receptores específicos, indicando ser um agente repartidor de

nutrientes moderado, ao contrário de outras substâncias comercialmente proibidas como o clenbuterol (STRYDOM et al., 2009).

A RAC não é classificada como hormônio, uma vez que estes são substâncias produzidas dentro do organismo em um local específico alcançando a corrente sanguínea para atuar em outro local. Os hormônios normalmente não podem ser oferecidos via ração, pois ao passarem pelo estômago são digeridos e não possuem efeito farmacológico desejado. Portanto, quando se fala no uso de hormônios de crescimento, por exemplo, a via de aplicação é injetável. No caso da RAC, a base do produto é sintética (ou seja, produzida fora do organismo) e é oferecida via ração sem sofrer degradação.

Devido à crescente utilização da RAC em aditivos alimentares para suínos, é de suma importância o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectar e quantificar este ativo na matéria-prima, no produto acabado (Ractosuin®), em pré-formulações enriquecidas com nutrientes de vitaminas e minerais (premix) e na ração. Além disso, a quantidade do produto acabado adicionado ao complexo vitamínico-mineral e à ração deve ser monitorada para garantir segurança para os animais e para os consumidores de carnes. Desta forma, a validação de métodos analíticos capazes de quantificar o fármaco nestas quatro etapas é essencial para se ter dados concretos da eficiência do produto quando usado de forma correta. A **Figura IG-1** apresenta as etapas em que serão realizadas as análises da RAC até chegar aos suínos e as respectivas quantidades de RAC presentes.

Figura IG-1. Quantidade de RAC presente em cada etapa de análise até chegar aos suínos.

1.1. Ractopamina (RAC)

A RAC é um β -agonista do grupo das fenetolaminas que são compostos que interagem com os receptores α e β -adrenérgicos. A estrutura destes

compostos é caracterizada pela presença de um anel aromático, uma cadeia lateral de etanolamina e um nitrogênio alifático. Além disso, a RAC (4-hidroxi- α -[[[3-(4-hidroxifenil)-1-metilpropil]-amino]metil]benzenometanol) contém dois centros quirais, existindo como uma mistura de quatro estereoisômeros ((1R, 3R), (1S, 3S), (1R, 3S) e (1S, 3R)) (**Figura IG-2**).

Figura IG-2. Estrutura molecular dos estereoisômeros da ractopamina (RAC).

O isômero RR é um potente cardiotônico em humanos e está associado à principal função e atividade estereoisomérica, mediando o crescimento da resposta em suínos, particularmente através do receptor β_2 -adrenérgico (MILLS et al., 2003, MILLS; SPURLOCK; SMITH, 2003).

Esta classe possui estrutura análoga às catecolaminas que podem ser divididas em naturais, como epinefrina e norepinefrina, e sintéticas, tais como clenbuterol, salbutamol, terbutalina, clenpenterol, clemproperol, bromobuterol e RAC. O salbutamol, clenbuterol e a RAC são os mais usados como agentes de repartição na suinocultura (WATKINS et al., 1990; SCHINKEL et al., 2003). A **Figura IG-3** apresenta a estrutura de alguns agonistas β -adrenérgicos.

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Nome
<p>Estrutura geral de agonistas β-adrenérgicos</p>	—H	—H	—OH	—OH	—H	norepinefrina
	—H	—H	—OH	—OH	—CH ₃	epinefrina
	—H	—H	—OH	—OH	—CH(CH ₃) ₂	isoproterenol
	—H	—OH	—H	—OH	—C(CH ₃) ₃	terbutalina
	—H	—CH ₂ OH	—OH	—H	—C(CH ₃) ₃	salbutamol
	—H	—Cl	—NH ₂	—CF ₃	—C(CH ₃) ₃	mabuterol
	—H	—Cl	—NH ₂	—Cl	—CH(CH ₃) ₂	clenproperol
	—H	—Cl	—NH ₂	—Cl	—C(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₃	clenbuterol
	—H	—Br	—NH ₂	—Br	—C(CH ₃) ₃	bromobuterol
	—H	—OH	—H	—OH	—CH(CH ₃)CH ₂ C ₆ H ₄ OH	fenoterol
	—H	—H	—OH	—H	—CH(CH ₃)(CH ₂) ₂ C ₆ H ₄ OH	ractopamina

Figura IG-3. Estrutura molecular de alguns agonistas β-adrenérgicos.

1.1.1. Farmacodinâmica

A RAC age no interior na membrana celular após a estimulação do receptor β-agonista. O complexo formado (fármaco/receptor) provoca a substituição do GDP (guanosina difosfato) ligado à Ge (proteína G estimulatória) por GTP (guanosina trifosfato) ativando a Ge. Esta proteína quando ativada induz uma modificação na fluidez da membrana levando a um deslocamento lateral e provocando estimulação da ação catalítica da enzima adenilato ciclase (AC). Esta enzima participa da formação do AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) a partir do ATP (trifosfato de adenosina), passando a atuar como segundo mensageiro. Assim, o AMPc ativa a proteína quinase (PQ) que conduz à fosforilação de enzimas responsáveis pela resposta final (**Figura IG-4**). As principais respostas celulares são: estimulação da lipólise, aumento da neoglicogênese, glicogenólise, aumentos da insulina, glucagon e renina, relaxamento da musculatura lisa e aumento da contração cardíaca (MOODY; HANCOCK; ANDERSON, 2000).

Figura IG-4. Mecanismo de ação dos β-agonistas adrenérgicos. Sendo: RAC: Ractopamina, Rec: receptor, GDP: guanosina difosfato; GTP: guanosina trifosfato; Ge: proteína G estimulatória, Geα: proteína G estimulatória subunidade α, AC: adenilato ciclase, AMPc: adenosina 3',5'- monofosfato cíclico, PQ: proteína quinase (Modificado de LEHNINGER; NELSON; COX, 2004).

A RAC interage com os receptores de membranas promovendo uma série de eventos que levam a um aumento do diâmetro das fibras brancas e intermediárias (AALHUS et al., 1992). A suplementação de RAC em suínos em terminação aumenta comprovadamente a quantidade de carne magra na carcaça (BARK et al., 1992; UTTARO et al., 1993; DUNSHEA et al., 1998; MARCHANT-FORDE et al., 2003; SEE; ARMSTRONG; WELDON, 2004; STAHL et al., 2007). Além disso, a RAC promove a diminuição da quantidade de gordura na carcaça sendo que estudos mostraram que esta substância inibe a produção de ácidos graxos nos cultivos celulares de várias espécies, além de estimular a degradação de triacilglicerol (LIU et al., 1994; ENGESETH et al., 1992).

PAGE et al. (2004) relataram que β-agonistas adrenérgicos, inclusive a RAC, aumentam a taxa de apoptose em tecido adiposo de ratos. Por outro lado, HAESE & BUNZEN (2005) sugerem que os efeitos atribuídos à RAC são: o aumento da atividade lipolítica e a inibição da lipogênese, pois a RAC inibe a ligação da insulina no receptor adrenérgico dos adipócitos, e assim, antagoniza a ação da insulina, diminuindo a síntese e a deposição de gorduras.

1.1.2. Farmacocinética

A RAC é rapidamente absorvida depois da administração oral tendo um pico plasmático entre 30 minutos e 2 horas. O tempo de meia vida de eliminação é cerca de 6 a 7 horas. Este fármaco também é rapidamente excretado em cães,

macacos e porcos quando administrada uma única dose de RAC (^{14}C). A maior parte deste fármaco marcado (de 85 a 95%) é excretada nas primeiras 24 horas, sendo a urina a maior via de excreção. Quando os suínos são alimentados com RAC (^{14}C) em uma única dose oral de 20 mg kg^{-1} de alimento, cerca de 88% da RAC radioativa é excretada na urina dentro de 7 dias. Outros 9% são recuperados nas fezes durante este tempo (DALIDOWICZ; BABBIT, 1986; DALIDOWICZ; THOMSON; HERBERG, 1986; SMITH, 1998; WILLIAMS, 1987).

A utilização da RAC em medicina veterinária e, sobretudo, como promotor do crescimento animal, recorre, principalmente, à via oral, onde o pH do trato gastro-intestinal influencia o local de absorção. O pH do estômago, independentemente da espécie ou da idade do animal, favorece a formação de um cátion na amina alifática, enquanto a natureza mais neutra do duodeno, jejuno e íleo, principalmente estes dois últimos, promove a redução da extensão da ionização e aumenta a absorção passiva através da mucosa intestinal (SMITH, 1998).

1.1.3. Biotransformação

Um estudo em suínos tratados com RAC (^{14}C) mostrou que a análise de fígados e rins de animais continha três principais metabólitos da RAC (**Figura IG-5**). Estes metabólitos foram formados por conjugação do grupo hidroxila no anel A ou B e são cromatograficamente distintos.

	R ₁	R ₂	Isômeros	Nome
			RS, SR	Metabólito A
			RS, SS	Metabólito B
			Mistura	Metabólito C

Figura IG-5. Estrutura molecular dos metabólitos da Ractopamina (RAC) em suínos, cães e ratos.

Os mesmos três metabólitos foram isolados da urina de suínos e todos eles foram identificados como monoglucuronídeos da RAC. Dos fígados extraídos,

30-50% continham RAC e o restante eram conjugados da RAC. Os rins continham uma maior quantidade de conjugados (64%) e, por consequência menor quantidade de RAC (20-30%). Os perfis cromatográficos dos extratos de resíduos de ^{14}C do fígado de rato, cão e porco foram quantitativamente semelhantes (DALIDOWICZ; BABBITT, 1986; DALIDOWICZ, 1986a; DALIDOWICZ, 1986b).

1.1.4. Análise da RAC

Na literatura existem vários trabalhos referentes à análise de RAC em diversos fluidos biológicos usando várias técnicas de análise. A técnica predominante de análise da RAC é por CLAE. Na **Tabela IG-1** estão apresentados alguns trabalhos que analisam a RAC por CLAE.

Tabela IG-1. Métodos para a análise da RAC encontrados na literatura.

Referência	Deteção	Coluna	Fase móvel	Matriz	Extração
SMITH ET AL., 1993	CLAE	C 18	fosfato de amônio 0,01M pH 4,5: acetonitrila (76:24)	tecidos urina	SPE
TURBERG; RODEWALD; COLEMAN, 1996	CLAE / Eletoquímico	C 18	tampão fosfato de amônio 0,05M pH 4,5: acetonitrila (79:21,5)	plasma soro	SPE
CHURCHWELL et al., 2002	LC/MS	C 18	acetato de amônio 0,13mM pH7: acetonitrila (75:25)	fígado	SPE
SHELVER; SMITH, 2002	CLAE / Fluorescência	C 18	acetonitrila: água: ác. acético contendo 1,08 g de ác.octanosulfônico (28: 72: 20)	tecidos	SPE ELL
SHISHANI et al., 2003	CLAE / Fluorescência e MS	C 18 C 16	acetonitrila: água: ác. acético: ác. 1- pentanosulfônico (32:68:20:0,87, v/v/v/g)	tecidos	ELL SPE
SHELVER; SMITH, 2003	CLAE / Fluorescência	C 18	octanosulfonato de sódio 5mM em 2% de ác. acético em água / acetonitrila (72:28)	urina	ELL
FIORI et al., 2005	LC/MS	C 8	metanol: ác. acético (100:1, v/v), gradiente	urina	SPE MIPs
BLANCA et al., 2005	LC/MS	C 12	ác. acético 0,1% (v/v) em água: ác. acético 0,1% (v/v) em acetonitrila:água (90:10), gradiente	fígado urina	SPE
QIANG et al., 2007	CLAE / Fluorescência	C 18	água: acetonitrila (80:20) com 2 mL de ác. acético e 0,7 g de ác. pentanosulfônico /L	tecidos urina soro	SPE LLE
MORAGUES; IGUALADA, 2009	LC/MS (Ion trap)	C 18	ác. acético10 mM: acetonitrila, gradiente	fígado urina	SPE

Na literatura também existem outros métodos de análise: INOUE & CHANG (2003) separaram os estereoisômeros da RAC por eletroforese capilar (CE). LEHNER et al. (2004) analisaram a ractopamina e seus metabólitos em urina de cavalos usando CG/MS tendo SPE como técnica de extração. HE et al. (2007) determinaram a RAC e clenbuterol em ração usando extração líquido-líquido e em fase sólida por CG/MS. SHAN et al. (2008), analisaram resíduos de 6 β -agonistas, entre eles a RAC em fígados de porco por CG/MS utilizando SPE. SHAO et al. (2009) analisaram resíduos de 16 β -agonistas no fígado, rim e músculo de suínos

por UPLC-MS/MS e SPE. WANG et al. (2010a) determinaram resíduos de orciprenalina, clenbuterol, salbutamol e RAC em ração, fígado e rim de suínos por CG/MS. WANG et al (2010b) determinaram 3 β -agonistas na urina, no fígado e em ração de suínos por CE com detector eletroquímico.

1.1.5. Limite máximo de resíduos para a Ractopamina

Foi realizada, em Genebra (Suíça, 2004), uma reunião do *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) com o propósito de avaliar resíduos de fármacos veterinários em alimentos. Esta reunião elaborou princípios para subsidiar a avaliação da segurança destes resíduos em alimentos, estabeleceu a dose aceitável de ingestão diária (ADI, do inglês *acceptable daily ingestion*) e os limites máximos de resíduos (LMR) quando estes fármacos são administradas em animais de produção de alimentos.

A ADI para a RAC foi estabelecida em 0-1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo, sendo que não existe período de carência para a retirada do produto antes do abate. A **Tabela IG-2** mostra os valores do LMR para a RAC, estabelecidos pelo JECFA.

Tabela IG-2. Limite máximo de resíduos (LMR) para a RAC em tecidos de bovinos e suínos.

Tecido	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Músculo	10
Gordura	10
Fígado	40
Rim	90

Fonte: *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Summary report of the sixty-second meeting of JECFA/62/SR, Rome, 4-12 February, 2004.*

Objetivos Gerais

OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos analíticos empregando a CLAE com detecção UV para a análise e quantificação da RAC presente na matéria-prima, no produto acabado Ractosuin[®] (Ourofino Agronegócio, Cravinhos, Brasil), na pré-mistura do Ractosuin[®] com complexo vitamínico-mineral e na mistura final com a ração. Para atender a estes objetivos, as seguintes etapas foram realizadas:

- 1** Desenvolver métodos analíticos para análise da RAC na matéria-prima, no produto acabado Ractosuin[®], no complexo vitamínico-mineral e na mistura final com a ração.
 - 2** Otimizar as condições analíticas para análise da RAC utilizando a CLAE nas quatro etapas propostas.
 - 3** Validar os métodos desenvolvidos quanto aos parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, estabilidade e robustez.
 - 4** Aplicar os métodos validados em laboratórios de controle de qualidade para quantificação da RAC nas quatro etapas propostas.
-

Capítulo 1: Desenvolvimento e validação de um método para análise de Ractopamina na matéria-prima e no produto Ractosuin[®]

1. INTRODUÇÃO

As matérias-primas representam o início da cadeia produtiva da indústria farmacêutica, portanto, o controle desses produtos é fundamental. A qualidade das matérias-primas usadas na indústria farmacêutica e/ou veterinária pode ser a diferença entre um produto eficiente ou não (GIL et al, 2005). A RDC 33 (ANVISA, 2000) institui as Boas Práticas de Manipulação que, entre outras determinações, estabelece como funções primárias do controle de qualidade avaliar a qualidade de matérias-primas, embalagens e fórmulas manipuladas, bem como inspeções no recebimento de matérias-primas. Todas estas etapas devem ser rigidamente controladas a fim de se ter um produto final de qualidade. Desta forma, a análise da matéria-prima da RAC é de suma importância para se ter um produto de qualidade.

A RAC é um pó, de coloração branca a creme e odor característico. O ponto de fusão está entre 124 a 129 °C e é solúvel em solventes polares (O'NEIL et al, 2001).

O Ractosuin® (Ourofino Agronegócio) é um produto à base de RAC indicado para uso exclusivo em suínos em fase de terminação, proporcionando o aumento da massa muscular, redução da deposição de gordura e aumento da quantidade de carne magra, melhorando a conversão alimentar e o rendimento da carcaça destes animais. Este produto é comercializado para ser adicionado à ração dos suínos em terminação na proporção de 250 a 1000 gramas do Ractosuin® por tonelada de ração, correspondente a 5 a 20 ppm de RAC, respectivamente.

A fim de garantir uma distribuição homogênea do produto na ração final, é necessário fazer uma pré-mistura do Ractosuin® com um complexo vitamínico-mineral e, posteriormente, adicionar esta mistura à ração. A única fonte de alimentação dos suínos nesta fase de criação deve ser a ração. O Ractosuin® não requer período de carência anteriormente ao abate dos suínos (disponível em www.ourofino.com).

A Tabela **C1-1** apresenta a composição do produto acabado Ractosuin®.

Capítulo 1

Tabela C1-1: Composição do produto Ractosuin®.

Constituição^a	Quantidades adicionadas em 1Kg de produto^a
Ractopamina	20,5g
Veículo	979,5g

^a Especificação do fabricante.

2. OBJETIVOS

O objetivo desta etapa do trabalho foi desenvolver um método analítico empregando a cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de RAC em amostras reais de matéria-prima e de produto acabado Ractosuin[®] (Ourofino Agronegócio). Para isto fez-se necessário o desenvolvimento das seguintes etapas:

- 1 Otimizar as condições para análise da RAC utilizando a CLAE.
 - 2 Validar o método para análise da RAC na matéria-prima e no produto Ractosuin[®].
 - 3 Aplicar o método desenvolvido e validado em análises de rotina de laboratórios de controle de qualidade de indústrias veterinárias.
-

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Material*

3.1.1. *Reagentes e solventes empregados no procedimento analítico*

Para as análises por CLAE, foram utilizados acetonitrila grau cromatografia e ácido acético glacial provenientes da J. T. Baker® Inc (Phillipsburg, EUA) para a preparação de fase móvel e de soluções-padrão. O acetato de sódio grau p.a. utilizado para a preparação do tampão da fase móvel também foi obtido da J. T. Baker® Inc (Phillipsburg, EUA). A água purificada para a preparação da fase móvel foi obtida no sistema MILLI-Q PLUS® – Millipore / Millipore Corporation (Bedford, EUA).

3.1.2. *Soluções-padrão*

O padrão primário de RAC (96,5%) foi obtido da Riedel Hæn (Seelze, Alemanha) e a matéria-prima foi adquirida da Iffect® (Shenzhen, China).

Para a validação do método para quantificação de RAC na matéria-prima e no produto acabado Ractosuin®, as soluções-padrão de RAC foram preparadas nas concentrações de 160,00, 180,00, 200,00, 220,00 e 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.1.3. *Equipamentos*

Durante o desenvolvimento e validação do método analítico foram utilizados equipamentos como balança analítica Shimadzu® Corp (Japão), modelo AW220, agitador vórtex IKA® (Janker Kunkel Staufen, Alemanha) e pHmetro Corning®, modelo 430 (Nova Iorque, EUA). Além disso, utilizou-se espectrofotômetro UV-visível - NIR Hitachi® modelo U-3501 (Tokyo, Japão), cromatógrafo a líquido Shimadzu® (Kyoto, Japão), composto por bomba modelo LC-20AT, detector por absorção no UV-Visível modelo SPD-20A, forno modelo CTO-20 A, injetor automático modelo SIL-20A e software Solutions Shimadzu® (Kyoto, Japão).

As colunas cromatográficas empregadas foram C8 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm de tamanho de partícula) Waters Co® (Milford, MA, USA) protegidas com uma coluna de guarda C8 (4,0 mm x 3,0 mm x 5 μm) Waters Co®.

3.2. Métodos

3.2.1. Otimização das condições cromatográficas para a análise de RAC

Para o desenvolvimento do método para análise de RAC uma alíquota de 800 µL da solução-estoque de RAC (concentração de 2,50 mg mL⁻¹) foi colocada em balão volumétrico de 10 mL contendo fase móvel. A solução final na concentração de 200,00 µg mL⁻¹ foi colocada em um vial e 10 µL foram analisados por CLAE/UV a uma temperatura de forno de 25 °C. Para definir as condições de análise e verificar a seletividade do método foram injetadas soluções-padrão, soluções de matéria-prima preparadas da mesma forma que as soluções-padrão, amostras do produto acabado Ractosuin[®] e também amostras do placebo do Ractosuin[®].

Utilizando-se de uma coluna em condições de fase reversa foram realizadas mudanças nas condições cromatográficas para otimização dos métodos, tais como: modificações da temperatura do forno, das fases móveis constituídas por misturas de acetonitrila e tampão acetato de sódio em diferentes valores de pHs e proporções (respeitando as limitações impostas pelo fabricante da coluna).

A separação cromatográfica foi avaliada pelo cálculo dos seguintes parâmetros: resolução (R_s), fator de retenção (k), fator de separação (α) e número de pratos teóricos (N).

A resolução (R_s) foi calculada pela **Equação 1**:

$$(1) \quad R_s = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right)$$

onde: t_{R1} e t_{R2} correspondem aos tempos do composto menos retido e do mais retido, respectivamente. Já w_{b1} e w_{b2} correspondem à largura dos picos menos retidos e mais retidos, respectivamente.

O fator de retenção (k) foi calculado pela **Equação 2**:

$$(2) \quad k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

onde: t_R corresponde ao tempo de retenção do composto de interesse e t_M ao tempo de retenção de um composto não retido na coluna.

O fator de separação (α) foi calculado pela **Equação 3**:

$$(3) \quad \alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

onde: k_1 corresponde ao fator de retenção do composto menos retido e k_2 ao fator de retenção do composto mais retido na coluna.

O número de pratos (N) foi calculado pela **Equação 4:**

$$(4) \quad N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2$$

onde: t_R corresponde ao tempo de retenção do composto de interesse e w_b a largura da base do pico do composto de interesse.

3.2.2. **Procedimento de preparação da amostra da matéria-prima e do Ractosuin®**

A amostra da matéria-prima foi preparada de forma idêntica às soluções-padrão, ou seja, a partir de uma solução-estoque de 2,50 mg mL⁻¹ diluída em fase móvel. Aliquotas de 800 µL desta solução foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com fase móvel a fim de obter uma solução na concentração de 200,00 µg mL⁻¹.

A amostra do produto acabado Ractosuin® foi primeiramente triturada em gral de porcelana a fim de garantir a homogeneidade do produto. Depois disso, foram pesados 975,7 mg desta amostra em balão volumétrico de 100 mL. Aproximadamente 80 mL de fase móvel foram colocados no balão volumétrico e este foi levado ao banho de ultrassom por 15 minutos. Após a amostra atingir a temperatura ambiente, o volume do balão foi completado com fase móvel e este foi agitado em vórtex por 2 minutos. A solução final contendo 200,00 µg mL⁻¹ de RAC (considerando que o produto Ractosuin® contém 2,05% de RAC) foi filtrada em filtros Millex® de 0,45 µm. Uma alíquota de 10 µL foi injetada e analisada por CLAE/UV.

A amostra do placebo do produto acabado Ractosuin® (PLAC 1) foi preparada de forma semelhante à do Ractosuin®. Primeiramente, a amostra também foi triturada em gral de porcelana. Feito isso, 955,7 mg do PLAC 1 foram pesados em balão volumétrico de 100 mL. Aproximadamente 80 mL de fase móvel foram colocados no balão volumétrico e este foi levado ao banho de ultrassom por 15 minutos. Após a amostra atingir a temperatura ambiente, o volume do balão foi completado com fase móvel e este foi agitado em vórtex por 2 minutos. A solução

final foi filtrada em filtros Millex[®] de 0,45 µm e uma alíquota de 10 µL foi injetada e analisada por CLAE/UV.

3.2.3. Validação do método analítico

Todo método analítico deve ser cientificamente respaldado pela credibilidade que uma validação analítica pode proporcionar quando realizada de forma confiável e documentada. Desta forma, o uso rotineiro por diferentes operadores, com equipamento similar, em diferentes laboratórios deve ser capaz, dentro de certos limites, de fornecer resultados confiáveis (USP 32, 2009).

Para avaliar a integridade e validade dos resultados das amostras analisadas em uma corrida analítica, um conjunto de procedimentos deve ser realizado. Estes procedimentos, comumente conhecidos como características de desempenho, incluem *system suitability*, seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, estabilidade e robustez.

3.2.3.1. System Suitability

O *system suitability* foi realizado para verificar o desempenho do sistema, isto é, garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados com precisão e exatidão aceitáveis.

Nesta validação, foram injetadas 5 vezes a mesma solução-padrão contendo 200,00 µg mL⁻¹ de RAC.

3.2.3.2. Estudo de seletividade

A seletividade de um método analítico é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em estudo na presença de componentes que podem interferir em sua análise. Neste item, foi analisado o PLAC 1 para verificação de possíveis interferentes presentes em seus constituintes e/ou seus produtos de degradação que poderiam interferir na quantificação do pico da RAC.

3.2.3.3. Linearidade

A linearidade é determinada pela análise de soluções contendo concentrações conhecidas do analito, abrangendo a faixa de concentração de interesse no trabalho.

Na validação do método para análise da RAC na matéria-prima, a linearidade foi avaliada construindo-se 3 curvas analíticas preparadas em 5 níveis de concentração compreendendo de 80 a 120% da concentração teórica do ensaio.

Foram preparadas 3 soluções-mãe de RAC para a construção das curvas analíticas. Em cada um dos 3 balões volumétricos de 25 mL, foram pesados 62,5 mg de RAC, solubilizados e diluídos com fase móvel. Para obtenção de cada ponto da curva analítica, foram aliqüotadas quantidades conhecidas de cada solução-mãe de RAC e solubilizadas em balão volumétrico de 10 mL com fase móvel, conforme descrito na **Tabela C1-2** abaixo:

Tabela C1-2: Concentração final dos padrões de RAC na validação da matéria-prima.

Pontos da Curva Analítica	Concentração Final dos Padrões ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume de solução-mãe (μL) adicionado em balão volumétrico de 10 mL
1	160,00	640
2	180,00	720
3	200,00	800
4	220,00	880
5	240,00	960

O parâmetro linearidade na validação do método para análise da RAC no produto Ractosuin[®] foi avaliado de forma semelhante à descrita acima, com a exceção de que todas as curvas analíticas foram construídas fortificando o PLAC 1 com o analito. O PLAC 1 foi fortificado com quantidades conhecidas de RAC, obedecendo ao mesmo intervalo de concentração estabelecido na validação da matéria-prima.

Cada um dos cinco pontos da curva analítica (160,00, 180,00, 200,00, 220,00 e 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RAC) foram preparados em triplicata a partir de 3 soluções-mãe de RAC (em balão volumétrico de 25 mL, pesou-se 625,0 mg de RAC e diluiu-se com fase móvel). Alíquotas de cada uma destas soluções-mãe foram adicionadas a quantidades conhecidas do PLAC 1 previamente pesadas em balão

volumétrico de 100 mL (**Tabela C1-3**). Em cada balão volumétrico, foram adicionados aproximadamente 80 mL de fase móvel e colocados em banho de ultrassom por 15 minutos. Após a amostra atingir a temperatura ambiente, o volume do balão foi completado com fase móvel, agitado em vórtex por 2 minutos e filtrado em filtros Millex® de 0,45 µm.

Tabela C1-3: Concentração final dos padrões de RAC na validação do produto Ractosuin®.

Pontos da Curva Analítica	Concentração Final dos Padrões (µg mL ⁻¹)	Volume de solução-mãe (µL) adicionado em balão volumétrico de 100 mL	Quantidade de placebo (mg) pesada em balão volumétrico de 100 mL
1	160,00	640	959,7
2	180,00	720	957,7
3	200,00	800	955,7
4	220,00	880	953,7
5	240,00	960	951,7

Três réplicas de cada ponto foram preparadas e 10 µL de cada preparação foram injetados no cromatógrafo a fim de verificar a resposta do detector para cada concentração.

As áreas dos picos foram registradas e colocadas no eixo das ordenadas e as concentrações da RAC foram colocadas no eixo das abscissas. A análise de regressão utilizada foi a dos mínimos quadrados onde a variável independente refere-se à concentração teórica da RAC na matriz (PLAC 1). A regressão foi representada graficamente pela equação da reta e a correlação pelos coeficientes de correlação (r de Pearson) e de determinação (r^2).

3.2.3.4. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os valores de LD e LQ foram calculados diretamente usando a curva de calibração. Foram utilizados os valores do *slope* e do desvio padrão (DP) do intercepto das médias das 3 curvas de calibração, segundo um modelo de regressão linear definido pelo ICH (*International Conference on Harmonisation*). Os fatores 3,3 e 10,0 para LD e LQ, respectivamente, foram multiplicados pelo quociente entre o desvio-padrão residual (SD) e o *slope* (correspondente ao erro padrão do *slope*).

O limite de detecção (LD) foi calculado pela **Equação 5**:

$$(5) \quad LOD = 3,3 \times \frac{\text{DP do intercepto}}{\text{média inclinação da curva}}$$

onde: DP corresponde ao desvio padrão residual.

O limite de quantificação (LQ) foi calculado pela **Equação 6**:

$$(6) \quad LOQ = 10 \times \frac{\text{DP do intercepto}}{\text{média da inclinação da curva}}$$

onde: DP corresponde ao desvio padrão residual.

3.2.3.5. **Precisão e exatidão**

A precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. As medidas podem ser simultâneas (precisão intraensaios) e podem ser intercaladas (precisão interensaios). Esse parâmetro é avaliado pelo coeficiente de variação (CV%) de acordo com a **Equação 7**:

$$(7) \quad CV(\%) = \frac{SD}{\bar{M}} \times 100$$

onde: *SD* representa a estimativa do desvio padrão e $\bar{M}$ a média dos valores de concentrações obtidos das amostras analisadas em replicata.

A exatidão é a diferença entre o valor real presente na amostra e o valor obtido na análise. É avaliada pelo afastamento entre os valores esperado e obtido, e pode ser representada pela **Equação 8**:

$$(8) \quad E_{(\%erro)} = \frac{\text{valor obtido} - \text{valor real}}{\text{valor real}} \times 100$$

onde: E (%) representa a porcentagem do erro relativo das amostras analisadas em replicata.

Para os estudos realizados com a matéria-prima e com o PLAC 1 fortificado com RAC, a precisão do método foi determinada através de estudos de repetibilidade e de precisão intermediária.

A repetibilidade foi avaliada em triplicata e em 3 diferentes concentrações (160,00, 200,00 e 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária também foi avaliada em triplicata e em 3 diferentes concentrações (160,00, 200,00 e 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$), mas em 2 dias diferentes (interensaios).

A exatidão foi avaliada pela aplicação do método de análise proposto a uma mistura do PLAC 1 com quantidades conhecidas de RAC, para obter concentrações de 160,00, 200,00 e 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, equivalentes a 80, 100, e 120% da concentração de trabalho.

Para avaliar estes parâmetros, na validação do produto Ractosuin[®], as soluções foram preparadas, em triplicata, da seguinte forma: a fim de se obter uma concentração de 160,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RAC, pesou-se 959,7 mg do PLAC 1 e 16,0 mg de RAC em balão volumétrico de 100 mL. A concentração de 200,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RAC foi obtida pesando-se 955,7 mg do PLAC 1 e 20,0 mg de RAC em balão volumétrico de 100 mL. Para a concentração de 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RAC, 951,7 mg do PLAC 1 e 24,0 mg de RAC foram pesados em balão volumétrico de 100 mL. Em cada balão volumétrico de 100 mL descrito acima, foram adicionados aproximadamente 80 mL de fase móvel e deixados em banho de ultrassom por 15 minutos. Após a amostra atingir a temperatura ambiente, o volume do balão foi completado com fase móvel e este foi agitado em vórtex por 2 minutos. Depois disso, a solução foi filtrada em filtros Millex[®] de 0,45 μm e uma alíquota de 10 μL foi injetada e analisada por CLAE/UV.

Na validação do método para quantificação da RAC na matéria-prima, as amostras foram preparadas, em triplicata, pesando-se 62,5 mg de RAC em balão volumétrico de 25 mL e diluindo-se com fase móvel. Para obter concentrações de 160,00, 200,00 e 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, alíquotas de, respectivamente, 640 μL , 800 μL e 960 μL foram colocadas em balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com fase móvel. Foram injetados 10 μL de amostra e analisado por CLAE/UV.

3.2.3.6. Estudo de estabilidade

No estudo de estabilidade, foram empregadas amostras da solução-padrão da matéria-prima de RAC na concentração de 200,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e do produto Ractosuin[®] na mesma concentração. Estas soluções foram colocadas em *vials*,

armazenadas no auto-injetor e injetadas no cromatógrafo em intervalos de tempo pré-determinados. Os resultados (áreas) foram comparados com aqueles obtidos das análises das amostras recém-preparadas.

3.2.3.7. *Estudo de robustez*

Para análise da robustez, foi utilizada uma amostra da solução-padrão da matéria-prima de RAC na concentração de 200,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e uma amostra do produto Ractosuin[®] nesta mesma concentração. Cada uma destas amostras foram injetadas frente a algumas variações do método cromatográfico, tais como vazão, temperatura da coluna e diferentes lotes da mesma coluna (C8). Os resultados (áreas) foram comparados com aqueles obtidos em amostras analisadas no método de trabalho definido.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *Otimização das condições cromatográficas para análise da RAC*

4.1.1. *Determinação do comprimento de onda para detecção*

Pela avaliação dos espectros de absorção obtidos na região do ultravioleta no intervalo de 200 a 400 nm, foi possível estabelecer o comprimento de onda para a análise de RAC (**Figura C1-1**). O comprimento de onda estabelecido para as análises de matéria-prima e do produto acabado Ractosuin® foi 275 nm.

Figura C1-1. Espectros de absorção na região UV da RAC em fase móvel na concentração de 200,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.1.2. *Otimização das condições cromatográficas para a análise da RAC.*

As condições analíticas foram escolhidas depois de serem avaliados diferentes parâmetros como pH da fase móvel, concentração molar e tipo do tampão e proporções entre fase orgânica e aquosa. Estes parâmetros foram ajustados para se obter um formato de pico desejável, resolução entre os picos e ausência de interferentes no tempo de retenção da RAC.

Neste item, serão citadas as condições cromatográficas que foram mais significativas durante o desenvolvimento do método para análise do produto acabado Ractosuin® e da matéria-prima RAC. Em todas as condições

cromatográficas avaliadas, foram injetadas as amostras da matéria-prima RAC, do produto Ractosuin[®] e do PLAC 1 preparadas conforme o item 3.2.2. deste capítulo.

Inicialmente, foi utilizada uma fase móvel constituída de água com aditivo ácido e acetonitrila (75: 25 v/v). Em 500 mL de água, foi adicionado 10 mL de ácido acético e o pH foi ajustado para 9,0 com trietilamina. As demais condições cromatográficas utilizadas foram: coluna C8 Waters Co[®] (250 mm x 4,6 mm x 5 µm); coluna de guarda C8 Waters Co[®] (4,0 mm x 3,0 mm x 5 µm); vazão de 1,2 mL min⁻¹; forno da coluna a 25 °C e detecção 275 nm. Esta condição não foi satisfatória, uma vez que o pico da RAC eluiu com bastante cauda.

A outra condição avaliada seguiu os mesmos parâmetros cromatográficos descritos anteriormente, com exceção da fase móvel que foi alterada para água com aditivo ácido pH 9,0, acetonitrila e metanol (65:10:25, v/v/v). Sob estas condições experimentais, a RAC foi eluída sob a forma de dois picos.

A próxima condição cromatográfica utilizada foi: fase móvel tampão acetato de sódio 0,100 mol L⁻¹ pH 4,0 e acetonitrila (75: 25 v/v), coluna C8 Waters Co[®] (250 mm x 4,6 mm x 5 µm); coluna de guarda C8 Waters Co[®] (4,0 mm x 3,0 mm x 5 µm); vazão de 1,2 mL min⁻¹, forno da coluna a 25 °C e detecção 275 nm. Nesta condição o pico da RAC apresentou-se com um formato arredondado, mas não houve interferência do placebo no tempo de retenção da RAC.

Visando um formato de pico mais simétrico, foram feitos alguns ajustes no método cromatográfico descrito no parágrafo anterior. A condição analítica escolhida foi: tampão acetato de sódio 0,100 mol L⁻¹ pH 5,0: acetonitrila (75: 25, v/v) como fase móvel, coluna C8 Waters Co[®] (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), vazão de 1,0 mL min⁻¹, forno da coluna a 25 °C e detecção a 275 nm (**Tabela C1-4**).

Tabela C1-4: Condições cromatográficas para determinação de RAC na matéria-prima e no Ractosuín®.

Condições	Método Otimizado
Equipamento	CLAE Shimadzu®
Fase móvel	Tampão acetato de sódio 0,100 mol L ⁻¹ pH 5,0/ acetonitrila (75:25, v/v)
Coluna	Coluna C8 Waters Co® (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Coluna de guarda	Coluna de guarda Waters Co.® C8 (4,0 mm x 3,0 mm x 5 µm)
Comprimento de onda	275 nm
Vazão	1,0 mL min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL
Temperatura	25 °C
Tempo de retenção	5,2 min

Sob estas condições experimentais, os cromatogramas de RAC na matéria-prima (**Figura C1-2**) e no produto Ractosuín® (**Figura C1-3**) mostraram o pico do ativo eluindo em torno de 5,2 minutos.

Figura C1-2. Cromatograma referente à matéria-prima de RAC. Condições cromatográficas: coluna C8 Waters Co® (250 mm x 4,6 mm x 5 µm); coluna de guarda C8 Waters Co® (4,0 mm x 3,0 mm x 5 µm); fase móvel: tampão acetato de sódio 0,100 mol L⁻¹ pH 5,0: acetonitrila (75: 25, v/v); vazão de 1,0 mL min⁻¹; forno da coluna a 25 °C e detecção 275 nm.

Figura C1-3. Cromatograma referente ao produto acabado Ractosuín®. Condições cromatográficas: coluna C8 Waters Co® (250 mm x 4,6 mm x 5 µm); coluna de guarda C8 Waters Co® (4,0 mm x 3,0 mm x 5 µm); fase móvel: tampão acetato de sódio 0,100 mol L⁻¹ pH 5,0; acetonitrila (75: 25, v/v); vazão de 1,0 mL min⁻¹; forno da coluna a 25 °C e detecção 275 nm.

4.2. Validação do método analítico desenvolvido

A validação de um método é realizada para demonstrar que a concentração dos analitos presentes na matriz é adequada para a aplicação do método em amostras reais. Desta forma, a validação do método de análise da RAC foi realizada para avaliar a quantidade de RAC presente na matéria-prima e no produto acabado Ractosuín®. A validação deste método seguiu recomendações da literatura (ANVISA, 2003; USP 32, 2009).

4.2.1. System suitability

O *system suitability* foi realizado antes de cada dia de validação. Foram feitas cinco injeções de solução-padrão e os seguintes parâmetros foram avaliados: assimetria, número de pratos teóricos e coeficiente de variação (CV) da área do pico e tempo de retenção. A **Tabela C1-5** mostra a performance do sistema para a

validação da matéria-prima e do Ractosuin® e os valores recomendados para cada parâmetro avaliado segundo a USP 32 (2009) e o fabricante da coluna cromatográfica utilizada.

Para todas as injeções do *system suitability*, a assimetria foi menor que 2,0, o número de pratos teóricos foi maior que 6500 e os CV (%) da área do pico e do tempo de retenção foram menores que 2,0 %.

Tabela C1-5. Resultados do *system suitability* da RAC na validação do método da matéria-prima e do Ractosuin®.

Parâmetros	Recomendações	Dia ^a	Mínimo	Máximo	CV (%) ^b
Tempo de retenção	CV (%) ^c < 2	Dia 1	5,189	5,194	0,04
		Dia 2	5,162	5,165	0,03
Área	CV (%) ^c < 2	Dia 1	856222	860238	0,18
		Dia 2	857664	859278	0,07
Pratos Teóricos	Valores > 2000	Dia 1	6292	6432	0,81
		Dia 2	6450	6509	0,38
Assimetria	Valores < 2	Dia 1	1,165	1,169	0,12
		Dia 2	1,162	1,167	0,14

^a O primeiro dia de validação foi realizada pelo analista 1 e o segundo dia pelo analista 2;

^b Valores de 5 replicatas;

^c CV(%), desvio padrão relativo expresso em porcentagem.

4.2.2.1. Estudo de seletividade

Após obter a melhor condição cromatográfica e de preparação das amostras, o PLAC 1 foi submetido ao processo de extração e analisado para identificação de possíveis interferentes. As análises do PLAC 1 foram realizadas para verificar possíveis interferentes decorrentes dos constituintes e/ou produtos de degradação das substâncias presentes no excipiente da formulação.

A **Figura C1-4** mostra os cromatogramas do PLAC 1 e da fase móvel quando submetidos à análise nas condições cromatográficas definidas. A **Figura C1-5** apresenta um cromatograma da análise do Ractosuin®, sendo possível visualizar o pico da RAC e alguns interferentes que eluem próximo ao seu tempo de retenção, mas que não influenciam na quantificação da RAC.

Figura C1-4. Cromatogramas referentes à fase móvel (A) e ao PLAC 1 (B). Condições cromatográficas: coluna C8 Waters Co[®] (250 mm x 4,6 mm x 5 µm); coluna de guarda C8 Waters Co[®] (4,0 mm x 3,0 mm x 5 µm); fase móvel: tampão acetato de sódio 0,100 mol L⁻¹ pH 5,0: acetonitrila (25: 75, v/v); vazão de 1,0 mL min⁻¹; forno da coluna a 25 °C e detecção 275 nm.

Figura C1-5. Cromatograma referente à separação da RAC no produto Ractosuin[®] e seus interferentes adjacentes. (1) Interferente A, (2) RAC e (3) Interferente B. Condições cromatográficas: coluna C8 Waters Co[®] (250 mm x 4,6 mm x 5 µm); coluna de guarda C8 Waters Co[®] (4,0 mm x 3,0 mm x 5 µm); fase móvel: tampão acetato de sódio 0,100 mol L⁻¹ pH 5,0: acetonitrila (25: 75, v/v); vazão de 1,0 mL min⁻¹; forno da coluna a 25 °C e detecção 275 nm.

A **Tabela C1-6** mostra alguns parâmetros cromatográficos, como resolução, fator de retenção, fator de separação e número de pratos teóricos obtidos para a RAC na matéria-prima e no produto acabado Ractosuin®.

Tabela C1-6. Parâmetros cromatográficos obtidos para a RAC na matéria-prima e no Ractosuin®.

Parâmetros	Dia	Interferente A	RAC	Interferente B
R_s^a	Dia 1	-	2,23	6,01
	Dia 2	-	2,20	6,06
k^b	Dia 1	0,92	1,14	1,77
	Dia 2	0,92	1,14	1,75
α^c	Dia 1	-	1,24	1,55
	Dia 2	-	1,24	1,54
N^d	Dia 1	7612,46	6349,98	11460,89
	Dia 2	7378,42	6481,91	11749,28

^a R_s , resolução;

^b k , fator de retenção para o primeiro pico eluído ($t_m = 2,43$ min, definido como um distúrbio significativo na linha de base, correspondendo ao tempo de retenção do soluto não retido);

^c α , fator de separação;

^d N , pratos teóricos.

Com a otimização das análises, o *system suitability* e os estudos de seletividade concluídos, prosseguiu-se a validação do método para avaliação das características de desempenho expressas através da linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, estabilidade e robustez.

4.2.3. Linearidade

A linearidade mede a capacidade de um método analítico em gerar resultados proporcionais (ou outras transformações matemáticas bem definidas) às concentrações da espécie em análise, dentro de uma faixa de concentração específica (PENG; CHIOU, 1990; CAUSON, 1997).

Os coeficientes de determinação (r^2) e correlação (r) foram calculados em cada réplica da curva de calibração. As curvas analíticas foram construídas colocando-se no eixo das abscissas as concentrações da RAC e no eixo das ordenadas a área dos picos obtidos.

A partir da análise estatística da regressão linear dos mínimos quadrados foi possível afirmar que os métodos desenvolvidos possuem excelente correlação entre concentração e resposta, visto que os valores obtidos para o coeficiente de correlação foram maiores que 0,99.

Para a análise da RAC, foram feitas curvas analíticas no intervalo de concentração de 160,00 a 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A equação da curva analítica, coeficiente de determinação e regressão estão representados na **Figura C1-6** para a análise de matéria-prima e na **Figura C1-7** para análise do PLAC 1 fortificado com RAC.

Figura C1-6. (A) Curva analítica demonstrando o coeficiente de determinação e de correlação para RAC na matéria-prima no intervalo de concentração de 160,00 a 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtida no 1º dia de validação. (B) Curva analítica demonstrando o coeficiente de determinação e de correlação para RAC na matéria-prima no intervalo de concentração de 160,00 a 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtida no 2º dia de validação.

Figura C1-7. (A) Curva analítica demonstrando o coeficiente de determinação e de correlação para o PLAC 1 fortificado com RAC no intervalo de concentração de 160,00 a 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtida no 1º dia de validação. (B) Curva analítica demonstrando o coeficiente de determinação e de correlação para o placebo fortificado com RAC no intervalo de concentração de 160,00 a 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtida no 2º dia de validação.

As curvas analíticas da **Figura C1-7** foram preparadas na matriz, ou seja, fortificando-se o PLAC 1 com diferentes concentrações conhecidas de RAC.

4.2.4. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do composto em estudo que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (CAUSON, 1997).

Para o cálculo de LD e LQ, foram utilizadas as equações das curvas analíticas. No método de análise da RAC, a menor concentração detectável foi de $1,28 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o produto Ractosuin® e $1,60 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a matéria-prima e a menor concentração quantificável foi de $4,26 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o produto Ractosuin® e $5,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a matéria-prima (**Tabela C1-7**).

Tabela C1-7. Limite de detecção e quantificação do método validado^a de análise da RAC.

RAC	Dia	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Matéria-prima	1	1,60	5,33
	2	1,99	6,63
Ractosuin®	1	1,28	4,28
	2	2,05	6,84

^a Curva de calibração: 160,00, 180,00, 200,00, 220,00 e 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a RAC, $n = 3$ para cada concentração;

4.2.5. Precisão e exatidão

A precisão geralmente é expressa como porcentagem do coeficiente de variação (CV%). A precisão e exatidão podem ser medidas da repetibilidade que se refere ao uso do procedimento analítico no laboratório, por um curto período, usando o mesmo analista e o mesmo equipamento (precisão e exatidão intraensaio). Já a precisão e exatidão interensaio se referem ao uso do procedimento analítico em diferentes condições. A precisão e exatidão são os critérios mais importantes para a avaliação de um método, pois determinam o erro da análise (PENG; CHIOU, 1990).

4.2.5.1. Precisão intra e interensaio

Na avaliação da precisão do método analítico foram empregadas as seguintes concentrações de RAC: 160,00, 200,00 e 240,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para as três concentrações analisadas pode-se verificar que os coeficientes de variação obtidos

estão entre 0,05 e 1,09% (intraensaio) e entre 0,13 e 0,75% (interensaio) para a matéria-prima de RAC. Os coeficientes de variação para o PLAC 1 fortificado com RAC variou entre 0,03 e 1,87% (intraensaio) e 0,06 e 1,33 % (interensaio).

Os valores referentes à precisão intra e interensaios para a análise da matéria-prima de RAC e para o PLAC 1 fortificado com RAC encontram-se descritos, respectivamente, nas **Tabelas C1-8 e C1-9**.

Tabela C1-8. Precisão do método para análise da RAC na matéria-prima.

RAC	Dia	Matéria-prima		
Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		160,00	200,00	240,00
Intraensaio				
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Dia 1	160,28	200,59	240,31
	Dia 2	160,31	201,07	239,83
Precisão (CV, %) ^a	Dia 1	0,26	0,35	0,05
	Dia 2	0,35	1,09	0,09
Interensaio				
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		160,30	200,83	243,07
Precisão (CV, %) ^a		0,25	0,75	0,13

^a CV(%): coeficiente de variação expresso em porcentagem.

Tabela C1-9. Precisão do método para análise da RAC no produto acabado.

RAC	Dia	PLAC 1 fortificado		
Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		160,00	200,00	240,00
Intraensaio				
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Dia 1	156,42	194,30	236,46
	Dia 2	156,57	193,93	236,34
Precisão (CV, %) ^a	Dia 1	0,94	0,47	0,07
	Dia 2	1,87	0,64	0,03
Interensaio				
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		156,49	194,12	236,40
Precisão (CV, %) ^a		1,33	0,51	0,06

^a CV(%): coeficiente de variação expresso em porcentagem.

4.2.5.2. Exatidão intra e interensaios

As avaliações da exatidão intra e interensaios foram feitas utilizando os dados obtidos no estudo da precisão. É possível verificar que a exatidão variou de 99,93 a 100,54% (intraensaio) e de 100,03 a 100,42% (interensaio) para a matéria-

prima de RAC. A exatidão para o PLAC 1 fortificado com RAC variou entre 96,97 e 98,52% (intraensaio) e 97,06 e 98,50% (interensaio).

Os valores referentes à exatidão intra e interensaios para a análise da matéria-prima de RAC e para o PLAC 1 fortificado com RAC encontram-se descritos, respectivamente, nas **Tabelas C1-10 e C1-11**.

Tabela C1-10. Exatidão do método para análise da RAC na matéria-prima.

RAC	Dia	Matéria-prima		
Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		160,00	200,00	240,00
Intraensaio				
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Dia 1	160,28	200,59	240,31
	Dia 2	160,31	201,07	239,83
Exatidão (%)	Dia 1	100,18	100,30	100,13
	Dia 2	100,19	100,54	99,93
Interensaio				
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		156,49	194,12	236,40
Exatidão (%)		100,19	100,42	100,03

Tabela C1-11. Exatidão do método para análise da RAC no produto acabado.

RAC	Dia	PLAC 1 fortificado		
Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		160,00	200,00	240,00
Intraensaio				
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Dia 1	156,42	194,30	236,46
	Dia 2	156,57	193,93	236,34
Exatidão (%)	Dia 1	97,76	97,15	98,52
	Dia 2	97,86	96,97	98,48
Interensaio				
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		156,49	194,12	236,40
Exatidão (%)		97,81	97,06	98,50

Os valores obtidos para precisão e exatidão no método validado são adequados e aceitáveis para a realização das análises nesta faixa de concentração, uma vez que apresentaram valores de exatidão entre 97-103% e de CVs inferiores a 2,8% (AOAC, 1993).

4.2.6. Estudo de estabilidade

Muitos fármacos apresentam certa instabilidade durante o processo de coleta de amostras, estocagem, preparação e análise. Desta forma, faz-se necessário um estudo de estabilidade visando reproduzir as condições de manuseio e análise das amostras. O método desenvolvido e validado foi submetido ao estudo de estabilidade segundo recomendações da literatura (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

As áreas da RAC geradas tanto na análise da matéria-prima quanto no produto Ractosuin[®] foram comparadas com as amostras recém-preparadas. A **Tabela C1-12** mostra a porcentagem de RAC encontrada no estudo de estabilidade de uma solução 200,00 µg mL⁻¹ de RAC para a matéria-prima e para o produto Ractosuin[®], ambas mantidas no auto-injetor e analisadas em diferentes intervalos de tempo. Os valores dos coeficientes de variação foram inferiores a 1,0% tanto para análise da matéria-prima quanto para o Ractosuin[®]. Os experimentos foram realizados nos tempos 0, 6, 13, 18 e 27 horas.

Tabela C1-12. Teste de estabilidade da RAC na matéria-prima e no produto Ractosuin[®].

Tempo (horas)	Matéria-prima ^a	Ractosuin ^{®a}
	% encontrada	% encontrada
6	99,90	99,95
13	99,65	99,77
18	99,47	99,50
27	99,30	99,39
CV(%) ^b	0,29	0,27

^a média de 3 replicatas;

^b CV (%): coeficiente de variação expresso em porcentagem.

Nenhum dos estudos de estabilidade para a RAC apresentou valores estatisticamente diferentes das amostras frescas; evidenciando que a RAC, nas condições descritas, apresentou-se estável.

4.2.7. Estudo de robustez

Os resultados do estudo de robustez para o método desenvolvido estão apresentados na **Tabela C1-13**. Mesmo com todas as variações das

condições analíticas, os valores de concentração não apresentaram variações significativas quando comparadas à análise de matéria-prima e do Ractosuin® no método original. Os parâmetros avaliados no *system suitability* também foram avaliados na robustez e os resultados encontrados foram satisfatórios. Desta forma, o método analítico foi considerado robusto.

Tabela C1-13. Condições cromatográficas e valores encontrados durante o estudo de robustez.

Parâmetros investigados	Variações	RAC		RAC	
		Matéria-prima ^a		Ractosuin ^{®a}	
		Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% encontrada ^a	Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% encontrada ^a
Vazão (mL min^{-1})	0,98	203,54	101,77	198,25	99,13
	1,00	200,49	100,25	199,64	99,82
	1,02	197,72	98,86	197,93	98,97
Coluna	C8 Lote B	201,43	100,72	200,67	100,34
	C8 Lote A	200,49	100,25	199,64	99,82
	C8 Lote C	201,56	100,78	201,03	100,52
Temperatura da Coluna ($^{\circ}\text{C}$)	24	201,37	100,69	200,21	100,11
	25	200,49	100,25	199,64	99,82
	26	201,41	100,71	201,27	100,64

^aMédia da análise de 3 replicatas.

4.3. Aplicação do método

A aplicabilidade do método validado foi analisada pela determinação de RAC em amostras reais de matéria-prima do fornecedor Iffect® e do produto acabado Ractosuin® lote 001/08 - P. Os resultados obtidos apresentaram precisão satisfatória, o que pode ser evidenciado pelos valores de coeficiente de variação (CV). Tanto a matéria-prima quanto o produto acabado apresentaram-se de acordo com as especificações dos fabricantes (**Tabela C1-14**).

Tabela C1-14. Determinação de RAC em amostras de matéria-prima e produto acabado.

Amostras	Matéria-prima (RAC 100,5%p/p) ^a		Produto acabado (Ractosuin [®] 2,05%p/p) ^a	
	% de RAC encontrada	CV(%) ^b	% de RAC encontrada	CV(%) ^b
	(g RAC/100g Matéria-prima)		(g RAC/ 100g Ractosuin [®])	
1	99,72		2,00	
2	99,28	0,66	1,99	0,48
3	99,23		1,99	
4	100,66		2,01	

^a Especificação do fabricante;^b CV (%), desvio padrão relativo.

5. CONCLUSÕES

Para a quantificação da RAC na matéria-prima e no produto acabado Ractosuin[®] foi necessário o desenvolvimento e a validação de um método analítico. A análise da RAC nas duas etapas descritas acima foi realizada empregando a CLAE com coluna de fase reversa C8 Waters Co[®]. A fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila: tampão acetato de sódio 0,100 mol L⁻¹ pH 5,0 (25: 75, v/v) e a extração do ativo foi feita em fase móvel. O método desenvolvido apresentou características de desempenho adequadas para as análises pretendidas, tais como linearidade (160,00 a 200,00 µg mL⁻¹), precisão (CVs inferiores a 2,8%), exatidão (em torno de 100%), seletividade, limite de quantificação e robustez. Depois de desenvolvido e validado, o método foi utilizado para avaliar o teor da RAC na matéria-prima do fornecedor Iffect[®] e no produto Ractosuin[®] lote 001/08 - P da Ourofino Agronegócio.

Com base nos resultados obtidos, foi possível utilizar este método em análises de rotina no laboratório de controle de qualidade de indústria veterinária. A utilização deste método permitiu a análise de um grande número de amostras em um tempo relativamente curto.

Capítulo 2: Desenvolvimento e validação de um método para análise de Ractopamina no complexo vitamínico-mineral

1. INTRODUÇÃO

O complexo vitamínico-mineral é um suplemento a base de minerais, vitaminas e lisina, disponível comercialmente, e destinado ao balanceamento de rações utilizadas para suínos em terminação. Este complexo contém microelementos minerais na forma orgânica e tem a função de assegurar melhor aproveitamento dos minerais pelo animal (disponível em www.tortuga.com.br).

A **Tabela C2-1** mostra a composição do complexo vitamínico-mineral de acordo com o fornecedor Companhia Zootécnica Agrária Tortuga (Mairinque, Brasil).

Tabela C2-1: Constituição do complexo vitamínico-mineral.

Constituição ^a	Quantidades presentes no complexo vitamínico-mineral ^a
Vitamina B1	23,00 mg
B.H.T	300,00 mg
Vitamina A	160.000,00 UI ^b
Vitamina B6	20,00 mg
Cobalto	3,70 mg
Sódio	60,00 g
Colina	1.736,00 mg
Biotina	1,00 mg
Acido Pantotênico	300,00 mg
Vitamina E	240,00 UI ^b
Manganês	518,00 mg
Vitamina B12	320,00 µg
Ferro	2.160,00 mg
Zinco	2.610,00 mg
Vitamina D3	32.000,00 UI
Vitamina K3	40,00 mg
Vitamina B2	52,00 mg
Niacina	396,00 mg
Acido Folico	7,20 mg
Fitase	20.000,00 ftu ^c
Cobre	4.745,00 mg
Selênio	6,60 mg
Lisina	9,40 g
Iodo	7,00 mg
Fósforo	36,00 g
Cálcio	180,00 g

^a Especificação do fabricante; ^b Unidades Internacionais; ^c Unidades de Fitase.

Ao complexo vitamínico-mineral deve ser incorporado o Ractosuin® antes de estes dois componentes serem adicionados à ração. Este processo intermediário é necessário para garantir a homogeneidade da RAC na mistura final com ração.

Deve-se adicionar 62,5 g de Ractosuin® em 1 kg de complexo vitamínico-mineral para se ter 0,128% de RAC na pré-mistura (disponível em www.ourofino.com).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste segundo capítulo foi desenvolver um método analítico empregando a CLAE com detector de UV para quantificação de RAC em amostras do complexo vitamínico-mineral fortificadas com o produto acabado Ractosuin® (Ourofino Agronegócio). Para isto fez-se necessário o desenvolvimento das seguintes etapas:

- 1 Otimizar as condições para análise da RAC no complexo vitamínico-mineral utilizando a CLAE.
 - 2 Validar um método analítico para análise da RAC no complexo vitamínico-mineral empregando a CLAE.
 - 3 Aplicar o método desenvolvido e validado em análises de rotina em laboratórios de controle de qualidade de indústrias veterinárias.
-

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Material*

3.1.1. *Reagentes e solventes empregados no procedimento analítico*

Nas análises por CLAE, os seguintes solventes orgânicos foram utilizados para a preparação de fase móvel e de soluções-padrão: acetonitrila grau cromatografia, acetato de etila e ácido acético glacial provenientes da J. T. Baker[®] Inc (Phillipsburg, EUA). O fosfato de sódio monobásico anidro grau p.a. utilizado para a preparação do tampão da fase móvel e o hidróxido de sódio foram obtidos da Synth[®] (Diadema, Brasil). A fase móvel foi preparada utilizando água purificada obtida no sistema MILLI-Q PLUS[®] – Millipore / Millipore Corporation (Bedford, EUA).

3.1.2. *Soluções-padrão*

Para a validação do método para quantificação de RAC no complexo vitamínico-mineral adicionado do produto Ractosuin[®], as soluções-padrão foram preparadas nas concentrações de 90,00, 120,00, 135,00, 150,00, 165,00, 180,00 e 210,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir de uma solução estoque de 25,72 mg mL^{-1} . Para obtenção desta solução estoque, 643,0 mg de RAC foram pesados em balão volumétrico de 25 mL, solubilizados e diluídos em água.

3.1.3. *Equipamentos*

Durante o desenvolvimento e validação do método analítico foram utilizados os seguintes equipamentos: balança analítica Shimadzu[®] Corp (Japão), modelo AW220, agitador vórtex IKA[®] (Janker Kunkel Staufen, Alemanha), pHmetro Corning[®], modelo 430 (Nova Iorque, EUA), centrífuga Excelsa II Fanem[®], modelo 206 BL (São Paulo, Brasil) e concentrador de amostras *Speed Vac* modelo SPD 1010 da Thermo Savant (Minnessota, EUA). Foi utilizado um cromatógrafo a líquido Shimadzu[®] (Kyoto, Japão), composto por bomba modelo LC-20AT, detector por absorção no UV-Visível modelo SPD-20A, forno modelo CTO-20 A, injetor automático modelo SIL-20A e software Solutions Shimadzu[®] (Kyoto, Japão).

A coluna cromatográfica empregada foi C18 Gemini[®] (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m) Phenomenex[®] (Torrance, CA, USA) protegida com uma coluna de guarda C18 (4,0 mm x 3,0 mm x 5 μ m) Phenomenex[®].

3.2. Métodos

3.2.1. Avaliação das condições cromatográficas para análise de RAC

As condições de análise foram definidas injetando-se a solução-padrão de RAC, a amostra da mistura do complexo vitamínico-mineral com o placebo do Ractosuin[®] e o complexo vitamínico-mineral acrescido de Ractosuin[®] após passarem pelo processo de extração, na concentração final de 150,00 μ g mL⁻¹.

A separação cromatográfica foi avaliada pelo cálculo dos parâmetros: resolução (R_s), fator de retenção (k), fator de separação (α) e número de pratos teóricos (N).

3.2.2. Procedimento de preparação da amostra do complexo vitamínico-mineral

A preparação das amostras do complexo vitamínico-mineral com Ractosuin[®] e da mistura do complexo vitamínico-mineral com o placebo do Ractosuin[®] foi feita através de extração líquido-líquido (ELL). A seguir, está descrito o procedimento utilizado no preparo das amostras.

A amostra do complexo vitamínico-mineral com adição de 6,25% de Ractosuin[®] foi primeiramente triturada em gral de porcelana. Foram pesados 880,0 mg (825,0 mg de complexo vitamínico-mineral e 55,0 mg de Ractosuin[®]) da amostra triturada em balão volumétrico de 25 mL. Aproximadamente 15 mL de água foram colocados no balão volumétrico e este foi levado ao banho de ultrassom por 15 minutos. Após a amostra atingir a temperatura ambiente, o volume do balão foi completado com água e este foi agitado em vórtex por 2 minutos. Em seguida, esta amostra foi centrifugada por 5 minutos a 3000 $\times$ g. Uma alíquota de 2 mL deste centrifugado foi colocada em um tubo de ensaio juntamente com 200 μ L de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹ e 3 mL de acetato de etila. A amostra foi agitada em vórtex por 4 minutos e novamente centrifugada a 3000 $\times$ g por 5 minutos a fim de separar a fase

aquosa da fase orgânica. O próximo passo foi recolher 1 mL da fase orgânica e evaporar em concentrador de amostras *Speed Vac* a uma temperatura de 35 °C. O resíduo seco foi ressuspensionado em 200 µL de fase móvel. Uma alíquota de 10 µL da solução final contendo 150,00 µg mL⁻¹ de RAC (considerando que a amostra do complexo vitamínico-mineral acrescida de Ractosuin[®] contém 0,128% de RAC) foi injetada e analisada por CLAE/UV.

O placebo (PLAC 2), utilizado na validação da RAC no complexo vitamínico-mineral, foi constituído de uma mistura de 93,75% de complexo vitamínico-mineral e 6,25% do placebo do Ractosuin[®].

A amostra do PLAC 2 foi preparada da mesma forma que a amostra do complexo vitamínico-mineral descrita acima.

3.2.3. Validação do método analítico

A validação do método seguiu os mesmos procedimentos adotados no Capítulo 1 (item 3.2.3). Foram avaliadas as seguintes características de desempenho: *system suitability*, seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, estabilidade e robustez.

3.2.3.1. System Suitability

Conforme mencionado no capítulo anterior, o *system suitability* foi realizado para verificar o desempenho do sistema. Nesta análise foram injetadas 5 vezes a mesma solução-padrão contendo 150,00 µg mL⁻¹ de RAC.

3.2.3.2. Estudo de seletividade

Neste item, o PLAC 2 foi analisado para verificação de possíveis interferentes presentes em seus constituintes e/ou seus produtos de degradação que poderiam interferir na quantificação da RAC.

3.2.3.3. Linearidade

A linearidade foi avaliada construindo-se 3 curvas analíticas com adição da RAC ao PLAC 2, contendo 7 níveis de concentração ($n = 3$) no intervalo de 90,00 a 210,00 µg mL⁻¹ (90,00, 120,00, 135,00, 150,00, 165,00, 180,00 e 210,00

$\mu\text{g mL}^{-1}$). Após a fortificação das amostras, estas foram submetidas ao procedimento de extração (item 3.2.2.) e análise.

Foram preparadas 3 soluções-mãe de RAC para a construção das curvas analíticas. Em três balões volumétricos de 25 mL, foram pesados 643,0 mg de RAC, solubilizados e diluídos com água. Para obtenção de cada ponto da curva analítica, foram aliqüotadas quantidades conhecidas de cada solução-mãe de RAC e diluídas com água para balão volumétrico de 10 mL (**Tabela C2-2**). Em balão volumétrico de 25 mL, alíquotas de 625 μL das soluções preparadas acima foram adicionadas a 880,0 mg do PLAC 2 previamente pesado e seguiu-se o processo de extração conforme descrito no item 3.2.2.

Tabela C2-2: Concentração final dos padrões de RAC na validação do complexo vitamínico-mineral.

Pontos da Curva Analítica	Concentração Final dos Padrões ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume de solução mãe (μL) adicionado em balão volumétrico de 10 mL
1	90,00	420
2	120,00	560
3	135,00	630
4	150,00	700
5	165,00	770
6	180,00	840
7	210,00	980

3.2.3.4. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

A determinação do LD e do LQ foi realizada enriquecendo amostras do PLAC 2 com concentrações de RAC variando de 0,05 a 45,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após submetidas ao processo de ELL. Para cada concentração, foram analisadas 2 replicatas e para a concentração considerada como LQ foram analisadas 6 replicatas. Considerou-se como LD a menor concentração correspondente a uma relação sinal/ruído = 3 e como LQ a menor concentração quantificada com relação sinal/ruído = 10 e coeficiente de variação menor que 10%.

3.2.3.5. Precisão e exatidão

Para a determinação dos parâmetros de precisão (intra e interensaios) e exatidão, foram utilizadas amostras do PLAC 2 fortificadas com o padrão de RAC.

A repetibilidade foi avaliada em triplicata e em 3 diferentes concentrações (120,00, 150,00 e 180,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária também foi avaliada em triplicata e em 3 diferentes concentrações (120,00, 150,00 e 180,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$), mas em 3 dias diferentes (inter-ensaios).

A exatidão foi avaliada pela aplicação do método de análise proposto ao PLAC 2 fortificado com quantidades conhecidas de RAC, para obter concentrações de 120,00, 150,00 e 180,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, equivalentes a 80, 100 e 120% da concentração de trabalho. A exatidão foi calculada como a porcentagem do princípio ativo que consegue ser recuperado da matriz.

Para avaliação destes parâmetros as soluções foram preparadas conforme descrito a seguir. Para se obter a concentração de 120,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RAC, pesou-se 9,0 mg de RAC e 8791,0 mg do PLAC 2 em balão volumétrico de 250 mL. A concentração de 150,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RAC foi obtida pesando-se 8788,7mg do PLAC 2 e 11,25 mg de RAC em balão volumétrico de 250 mL. Para a concentração de 180,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RAC, 8786,5 mg do PLAC 2 e 13,5 mg de RAC foram pesados em balão volumétrico de 250 mL. Em cada balão volumétrico preparado acima, foram colocados aproximadamente 150 mL de água e estes foram levados ao banho de ultrassom por 15 minutos. Após a amostra atingir a temperatura ambiente, os volumes dos balões foram completados com água e estes foram agitados em vórtex por 2 minutos. Em seguida, estas amostras foram centrifugadas por 5 minutos a $3000 \times g$. Aliquotas de 2 mL destes centrifugados foram colocadas em um tubos de ensaio contendo 200 μL de hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} e 3 mL de acetato de etila. As amostras foram agitadas em vórtex por 4 minutos e novamente centrifugadas a $3000 \times g$ por 5 minutos. Foram recolhidos 1 mL da fase orgânica e evaporadas em concentrador de amostras *Speed Vac* a uma temperatura de 35 °C. Os resíduos secos foram ressuspensos em 200 μL de fase móvel.

Os cálculos para se obter os valores da precisão e exatidão foram baseados em uma curva padrão com intervalo de concentração entre 120,00 a 180,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para análise do complexo vitamínico-mineral.

3.2.3.6. Recuperação

O teste de recuperação foi realizado para avaliar a eficiência do método de extração da amostra. A recuperação foi calculada pela **Equação 9**:

$$(9) \quad \text{Recuperação} = \frac{\text{média dos valores obtidos}}{\text{média dos valores reais}} \times 100$$

A recuperação do método utilizando ELL foi avaliada empregando os esquemas das **Figuras C2-1** e **C2-2**, ou seja, as soluções-padrão foram adicionadas antes e depois de realizar a partição das fases aquosa e orgânica.

O cálculo da porcentagem de ativo recuperado depois do processo de extração foi baseado em uma curva analítica construída adicionando a RAC após o procedimento de extração do PLAC 2 (**Figura C2-1**), ou seja, amostras do PLAC 2 foram submetidas à ELL e depois que a fase orgânica foi seca, foram adicionadas alíquotas dos padrões de RAC em concentrações determinadas. Este procedimento de adição de alíquotas de padrões de RAC depois da extração do placebo foi feito para mimetizar o efeito matriz, visto que não seria possível verificar os interferentes da matriz se fossem injetados somente padrões puros.

Figura C2-1. Esquema do procedimento empregado para a realização do teste de recuperação: adição das soluções-padrão depois da partição (concentrações reais).

Figura C2-2. Esquema do procedimento empregado para a realização do teste de recuperação: adição das soluções-padrão antes da partição (concentrações obtidas).

Os valores obtidos foram considerados como os sinais (área dos picos) das concentrações reais (**Figura C2-1**) e obtidas (**Figura C2-2**) do analito em questão. Ambas as análises foram feitas em triplicata para cada concentração.

3.2.3.7. *Estudo de estabilidade*

Para o estudo de estabilidade da RAC empregou-se amostras do PLAC 2 fortificadas ($n = 6$) em uma concentração baixa ($120,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) e outra alta ($180,00 \mu\text{g mL}^{-1}$). Foram avaliadas a influência de ciclos de congelamento ($-20 \pm 2^\circ\text{C}$) e descongelamento à temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Primeiramente, as amostras foram armazenadas a -20°C por 24 horas e descongeladas à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram recongeladas por 12 horas sob as mesmas condições e descongeladas novamente. A seguir, as amostras foram recolocadas no freezer por mais 12 horas e depois, descongeladas. As amostras foram analisadas ao final do terceiro ciclo. Outro teste foi avaliar a estabilidade analisando amostras congeladas ($-20 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 48 horas. Este período corresponde ao tempo máximo que as amostras foram mantidas congeladas. Além disso, o teste de estabilidade foi avaliado analisando amostras que foram mantidas em bancada durante 12 horas.

Os resultados (áreas) também foram comparados com aqueles obtidos das análises das amostras frescas. Comparações entre os parâmetros de estabilidade foram realizadas pelo *One-way ANOVA* (Origin[®] 7, Northampton, EUA) sendo valor de $p \leq 0,05$ considerado significativo.

3.2.3.8. *Estudo de robustez*

Para avaliação deste parâmetro foram utilizadas soluções-padrão de RAC e amostras do complexo vitamínico-mineral enriquecidas com Ractosuin[®]. A robustez do método foi avaliada pela variação de $\pm 2\%$ na vazão da fase móvel, na temperatura da coluna e na porcentagem de acetonitrila na fase móvel, considerando o método original. Estas três variáveis foram avaliadas utilizando *Box-Behnken Design*. Os fatores de resposta foram as concentrações de RAC nas soluções-padrão e nas amostras do complexo vitamínico-mineral adicionado de Ractosuin[®], e foram interpretados utilizando unidades codificadas pela aplicação de

um modelo quadrático completo. O coeficiente de regressão e os valores de probabilidade associados (*p-value*) nas soluções- padrão de RAC e nas amostras foram determinados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *Otimização das condições cromatográficas para análise da RAC*

As condições cromatográficas mais relevantes durante o desenvolvimento do método para análise da RAC no complexo vitamínico-mineral adicionado de Ractosuin[®] serão citadas neste item. Durante o desenvolvimento do método, foram injetadas, em cada condição avaliada, uma amostra do complexo vitamínico-mineral com Ractosuin[®] e do PLAC 2 preparadas conforme o item 3.2.2. deste capítulo.

Inicialmente, foram avaliadas as mesmas condições cromatográficas do método de análise da RAC na matéria-prima e no produto Ractosuin[®]. Neste método empregou-se tampão acetato de sódio 0,100 mol L⁻¹ pH 5,0: acetonitrila (75: 25, v/v) como fase móvel, coluna C8 Waters Co.[®], vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detecção em 275 nm. Esta condição não foi satisfatória, uma vez que houve interferência dos componentes do PLAC 2 no tempo de retenção da RAC.

Outra condição cromatográfica utilizada foi uma fase móvel constituída de tampão acetato de sódio 0,100 mol L⁻¹ pH 5,0: acetonitrila (80:20, v/v), fase estacionária C18 Phenomenex[®] Gemini (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) e o processo de extração líquido-líquido descrito no item 3.2.2. deste capítulo. Esta condição também apresentou interferência dos constituintes PLAC 2 no tempo de retenção da RAC, além de muitos ruídos no início do cromatograma.

Várias outras tentativas foram realizadas, variando-se a composição da fase móvel, e mantendo-se o mesmo processo de extração, mas nenhuma delas foi satisfatória. O desenvolvimento do método prosseguiu tentando-se mudar o tipo de sal e o pH do tampão de análise, visando a diminuição de ruídos no início da análise.

Em vista disso, utilizou-se como fase móvel tampão fosfato de sódio monobásico anidro 0,100 mol L⁻¹ pH 7,6 e acetonitrila na proporção de 75:25 (v/v), coluna C18 Phenomenex[®] Gemini (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), coluna de guarda C18 Phenomenex[®] (4,0 mm x 3,0 mm x 5 µm), vazão de 1,0 mL min⁻¹, temperatura da coluna a 25°C e detecção em 275 nm. Com esta condição cromatográfica, conseguiu-se eliminar os ruídos da linha de base próximos ao tempo de retenção da RAC. Alguns ajustes na fase móvel e na temperatura da coluna ainda foram

necessários para aumentar a resolução da RAC com picos adjacentes e para melhorar a assimetria do pico.

As condições analíticas foram escolhidas seguindo os mesmos parâmetros citados no item 4.1.2. do capítulo 1 e foram definidas usando tampão fosfato de sódio monobásico anidro 0,100 mol L⁻¹ pH 7,6: acetonitrila (74: 26, v/v) como fase móvel, vazão de 1,1 mL min⁻¹, forno da coluna a 40 °C e detecção a 275 nm (**Tabela C2-3**).

Tabela C2-3. Condições cromatográficas para determinação de RAC no complexo de vitaminas e minerais.

Condições	Método Otimizado
Equipamento	CLAE Shimadzu [®]
Fase móvel	Tampão fosfato de sódio monobásico anidro 0,100 mol L ⁻¹ (pH 7,6) - acetonitrila (74: 26, v/v)
Coluna	Coluna Gemini C18 Phenomenex [®] (250 mmx 4.6 mm x 5 µm)
Coluna de guarda	Coluna de guarda C18 Phenomenex [®] (4.0 mm x 3.0 mm x 5 µm)
Comprimento de onda	275 nm
Vazão	1,1 mL min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL
Temperatura	40 °C
Tempo de retenção	5,7 min

Sob estas condições experimentais, as **Figuras C2-3 e C2-4** mostram os cromatogramas do padrão de RAC adicionado ao PLAC 2 e do PLAC 2, respectivamente.

Figura C2-3. Cromatograma referente ao padrão de RAC adicionado ao PLAC 2. Condições cromatográficas: coluna C18 Phenomenex® Gemini (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m); coluna de guarda C18 Phenomenex® (4,0 mm x 3,0 mm x 5 μ m); fase móvel: tampão fosfato de sódio monobásico anidro 0,100 mol L⁻¹ pH 7,6: acetonitrila (74: 26, v/v); vazão de 1,1 mL min⁻¹; temperatura da coluna a 40 °C e detecção em 275 nm.

Figura C2-4. Cromatograma referente ao PLAC 2. Condições cromatográficas: coluna C18 Phenomenex® Gemini (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m); coluna de guarda C18 Phenomenex® (4,0 mm x 3,0 mm x 5 μ m); fase móvel: tampão fosfato de sódio monobásico anidro 0,100 mol L⁻¹ pH 7,6: acetonitrila (74: 26, v/v); vazão de 1,1 mL min⁻¹; temperatura da coluna a 40 °C e detecção em 275 nm.

4.2. Validação do método analítico desenvolvido

4.2.1. System suitability

O *system suitability* foi realizado antes de cada dia de validação. Foram feitas cinco injeções de solução-padrão e avaliaram-se os seguintes parâmetros: assimetria, número de pratos teóricos, resolução e coeficiente de variação (CV%) da área do pico e tempo de retenção.

A **Tabela C2-4** mostra a desempenho do sistema cromatográfico e os valores recomendados para cada parâmetro avaliado segundo a USP 32 (2009) e o fabricante da coluna cromatográfica utilizada.

Para todas as injeções do *system suitability*, a assimetria foi menor que 2,0, o número de pratos teóricos foi maior que 7000 e CV(%) da área do pico e do tempo de retenção foram menores que 2,0 %.

Tabela C2-4. Resultados do *system suitability* da RAC na validação do complexo vitamínico-mineral.

Parâmetros	Recomendações	Dia	Mínimo	Máximo	CV (%) ^a
Tempo de retenção	CV (%) ^b < 2	Dia 1	5,521	5,534	0,10
		Dia 2	5,714	5,724	0,07
		Dia 3	5,697	5,702	0,04
Área	CV (%) ^b < 2	Dia 1	638939	640805	0,11
		Dia 2	635335	637984	0,13
		Dia 3	638097	639634	0,09
Pratos Teóricos	Valores > 2000	Dia 1	7900,5	7937,9	0,20
		Dia 2	8337,2	8341,3	0,45
		Dia 3	8691,3	8774,9	0,35
Assimetria	Valores < 2	Dia 1	0,908	0,911	0,14
		Dia 2	1,021	1,025	0,15
		Dia 3	0,979	0,981	0,08

^a Valores de 5 replicatas;

^b CV(%), desvio padrão relativo expresso em porcentagem.

4.2.2. Estudo de seletividade

Para avaliação da seletividade, o PLAC 2 foi submetido ao processo de extração e analisado por CLAE para identificação de possíveis interferentes.

A **Figura C2-5** apresenta um cromatograma da análise do complexo vitamínico-mineral adicionado de Ractosuin[®], sendo possível visualizar o pico da

RAC e de um interferente que não interfere na quantificação da RAC. A **Tabela C2-5** mostra a resolução, o fator de retenção, o fator de separação e o número de pratos teóricos obtidos para a RAC.

Figura C2-5. Cromatograma referente à separação da RAC no complexo vitamínico-mineral acrescido de Ractosuín® e seu interferente adjacente. (1) RAC e (2) Interferente A. Condições cromatográficas: coluna C18 Phenomenex® Gemini (250 mm x 4,6 mm x 5 µm); coluna de guarda C18 Phenomenex® (4,0 mm x 3,0 mm x 5 µm); fase móvel: tampão fosfato de sódio monobásico anidro 0,100 mol L⁻¹ pH 7,6: acetonitrila (74: 26, v/v); vazão de 1,1 mL min⁻¹; temperatura da coluna a 40 °C e detecção em 275 nm.

Tabela C2-5. Parâmetros cromatográficos obtidos para a RAC no complexo vitamínico-mineral.

Parâmetros	Dia	RAC	Interferente A
Rs^a	Dia 1	-	3,707
	Dia 2	-	3,858
	Dia 3	-	3,869
k^b	Dia 1	0,96	1,25
	Dia 2	1,04	1,43
	Dia 3	1,04	1,36
α^c	Dia 1	-	1,30
	Dia 2	-	1,38
	Dia 3	-	1,31
N^d	Dia 1	6914,7	15865,7
	Dia 2	6431,3	16560,8
	Dia 3	6734,4	16134,9

^a Rs , resolução;

^b k , fator de retenção para o primeiro pico eluído ($t_m = 2,8$ min, definido como um distúrbio significativo na linha de base, correspondendo ao tempo de retenção do soluto não retido);

^c α , fator de separação;

^d N , pratos teóricos.

4.2.3. Linearidade

Para a análise da RAC no complexo vitamínico-mineral, foram feitas curvas analíticas na matriz (PLAC 2) e fortificadas com concentrações conhecidas de RAC no intervalo de concentração de 90,00 a 210,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A equação da curva analítica, coeficiente de determinação e regressão para análise do PLAC 2 fortificado com RAC estão representados na **Figura C2-6**.

Figura C2-6. Curva analítica demonstrando o coeficiente de determinação e de correlação para o PLAC 2 fortificado com RAC no intervalo de concentração de 90,00 a 210,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.4. Limite de detecção e quantificação

O LD foi determinado como a menor concentração correspondente a uma relação sinal/ruído = 3 e o LQ como a menor concentração quantificada com relação sinal/ruído = 10 e coeficiente de variação menor que 10%. Neste método de análise da RAC, a menor concentração detectável foi de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a menor concentração quantificável foi de 2,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.5. Precisão e exatidão

Para verificar a precisão do método analítico foram empregadas as seguintes concentrações de RAC: 120,00, 150,00 e 180,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Pode ser verificado que os coeficientes de variação, para as três concentrações analisadas, apresentaram-se entre 0,06 e 2,42% (intraensaio) e entre 1,03 e 1,46% (interensaio). Os valores referentes à precisão intra e interensaios para a análise do PLAC 2 fortificado com RAC encontram-se descritos na **Tabela C2-6**.

Tabela C2-6. Precisão do método para análise da RAC no complexo vitamínico-mineral.

RAC	Dia	PLAC 2 fortificado com RAC		
Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		120,00	150,00	180,00
Intraensaio				
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Dia 1	121,45	153,34	177,83
	Dia 2	122,97	151,13	178,81
	Dia 3	120,31	152,23	177,08
Precisão (CV, %) ^a	Dia 1	1,02	0,06	1,62
	Dia 2	1,10	2,42	2,16
	Dia 3	0,90	0,07	1,62
Interensaio				
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		120,91	152,23	177,91
Precisão (CV, %) ^a		1,03	1,44	1,46

^a CV(%): coeficiente de variação expresso em porcentagem.

As determinações da exatidão intra e interensaios também foram feitas utilizando os dados obtidos do estudo da precisão. Pode-se notar que a exatidão variou de 98,38 a 102,23% (intraensaio) e de 98,84 a 101,49% (interensaio).

Os valores referentes à exatidão intra e interensaios para a análise do PLAC 2 fortificado com RAC encontram-se descritos na **Tabela C2-7**.

Tabela C2-7. Exatidão do método analítico validado para análise da RAC no complexo vitamínico-mineral.

RAC	Dia	PLAC 2 fortificado com RAC		
Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		120,00	150,00	180,00
Intraensaio				
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Dia 1	121,45	153,34	177,83
	Dia 2	122,97	151,13	178,81
	Dia 3	120,31	152,23	177,08
Exatidão (%)	Dia 1	101,21	102,23	98,79
	Dia 2	100,81	100,75	99,34
	Dia 3	100,26	101,48	98,38
Interensaio				
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		120,91	152,23	177,91
Exatidão (%)		100,76	101,49	98,84

Os valores obtidos para precisão apresentaram coeficientes de variação (CVs) inferiores a 3,7% e exatidão entre 95 e 105%, valores considerados aceitáveis para a realização das análises nesta faixa de concentração (AOAC, 1993).

4.2.6. *Recuperação*

Segundo (CAUSON, 1997), a recuperação é fundamental para avaliar a eficiência do método de extração. Durante o procedimento de preparação de amostras podem ocorrer perdas por extração incompleta, adsorção, perda de volume ou co-precipitação. Para que ocorra menores perdas dos fármacos é necessário uma otimização das condições de extração (PENG; CHIOU, 1990).

Na **Tabela C2-8** são mostrados os resultados referentes à recuperação da RAC. De acordo com estes dados, pode-se verificar que houve uma boa recuperação (em torno de 94%) para o analito em estudo.

Tabela C2-8. Recuperação (R%) do método de análise da RAC no complexo vitamínico-mineral.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RAC	
	R (%)	CV(%)
120,00	93,32	1,32
150,00	94,35	1,52
180,00	93,68	0,04
Médias	93,79	0,96

4.2.7. *Estudo de estabilidade*

As áreas da RAC obtidas pela extração do PLAC 2 acrescido de quantidades conhecidas de RAC, sob a influência de ciclos de congelamento/descongelamento, congelamento por 48 horas e bancada por 12 horas foram comparadas com as áreas das amostras recém-preparadas. A **Tabela C2-9** mostra a porcentagem de RAC encontrada após cada ciclo em estudo para concentrações de 120,00 e 180,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores dos coeficientes de variação foram menores que 2,0%.

Tabela C2-9. Teste de estabilidade da RAC no complexo vitamínico-mineral.

Concentração Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RAC	
	<i>p-value</i>	CV ^b (%)
12 horas Temperatura ambiente^a		
120,00	0,47	0,83
180,00	0,79	1,40
Ciclos de Congelamento e Descongelamento^a		
120,00	0,15	1,42
180,00	0,54	1,15
48 horas Congelamento^a		
120,00	0,58	1,45
180,00	0,34	1,12

^a $n = 6$: n , número de replicatas;^b CV, coeficiente de variação expresso em porcentagem;

Os estudos de estabilidade da RAC evidenciaram valores estatisticamente semelhantes aos das amostras frescas; evidenciando que este ativo é estável quando submetido a diferentes condições de análise.

4.2.8. Estudo de robustez

Os resultados do estudo de robustez utilizando o *Box-Behnken Design* estão apresentados na **Tabela C2-10**. A **Tabela C2-11** apresenta os coeficientes de regressão e os respectivos valores de probabilidade (*p-value*) das respostas da RAC na solução-padrão e na amostra do complexo vitamínico-mineral. Os valores obtidos mostram que as variações dos parâmetros não foram estatisticamente significativas nem na análise da solução padrão e nem na amostra, uma vez que todos os valores apresentaram $p > 0,05$. O mesmo vale para os modelos quadráticos indicando que os efeitos não causaram interações significativas. Estes resultados indicaram que o método analítico foi robusto, uma vez que as variações dos parâmetros experimentais não produziram quaisquer efeitos estatisticamente significativos na concentração da solução-padrão e da amostra do complexo vitamínico-mineral.

Tabela C2-10. Parâmetros experimentais e valores de respostas para a robustez do método do complexo vitamínico-mineral usando *Box-Behnken Design*.

Corrida	Vazão (mL min ⁻¹)	Temp. (°C)	% ACN na Fase Móvel	Conc. Solução Padrão (µg mL ⁻¹)	Conc. Amostra (µg mL ⁻¹)
1	1,10	39	26,5	149,28	145,45
2	1,08	40	25,5	151,39	148,26
3	1,12	39	26,0	150,77	142,99
4	1,12	41	26,0	150,63	143,27
5	1,08	40	26,5	151,97	148,35
6	1,10	41	26,5	150,05	145,86
7	1,10	39	25,5	152,81	145,16
8	1,10	41	25,5	153,33	145,68
9*	1,10	40	26,0	153,57	145,76
10*	1,10	40	26,0	153,77	146,03
11*	1,10	40	26,0	149,94	146,11
12	1,08	41	26,0	152,93	157,19
13	1,12	40	26,5	150,30	151,13
14	1,12	40	25,5	150,39	150,96
15	1,08	39	26,0	149,97	156,72

*Pontos centrais.

Tabela C2-11. Coeficientes de regressão e valores de probabilidade associados (*p*-value) para a resposta das concentrações da solução padrão de RAC e da amostra de complexo vitamínico-mineral.

Termo	Concentrações das Amostras		Concentrações das Soluções Padrão	
	Coeficiente	<i>p</i> -value ^a	Coeficiente	<i>p</i> -value ^a
Constante	145,967	0,000	152,427	0,000
Vazão	-2,774	0,195	-0,522	0,452
Temperatura	0,211	0,914	0,514	0,460
Fase Móvel	0,092	0,962	-0,789	0,273
Vazão x Vazão	4,106	0,193	0,854	0,470
Temperatura x Temperatura	-0,032	0,991	-0,498	0,620
Fase Móvel x Fase Móvel	-0,397	0,890	-0,560	0,579
Vazão x Temperatura	-0,047	0,986	-0,775	0,432
Vazão x Fase Móvel	0,019	0,994	-0,168	0,861
Temperatura x Fase Móvel	-0,026	0,992	0,061	0,949

^a Considerando *p* - value < 0,05.

4.3. Aplicação do método

O método validado foi aplicado em amostras reais do complexo vitamínico- mineral, ao qual foi incorporado o Ractosuin[®]. Foram coletadas amostras da parte inferior, central e superior da embalagem contendo o produto a fim de se avaliar a homogeneidade do mesmo. Os resultados obtidos apresentaram precisão satisfatória e mostraram-se de acordo com as especificações pré-estabelecidas do fabricante (**Tabela C2-12**).

Tabela C2-12. Determinação de RAC em amostras de complexo vitamínico-mineral.

Amostras	Complexo vitamínico-mineral (0,128% p/p RAC) ^a	
	% RAC encontrada	CV(%) ^b
	(g RAC/100 g Complexo vitamínico-mineral)	
Superior 1	0,126	0,79
Superior 2	0,127	
Superior 3	0,128	
Meio 1	0,129	1,18
Meio 2	0,128	
Meio 3	0,131	
Inferior 1	0,132	1,32
Inferior 2	0,129	
Inferior 3	0,132	
Média	0,129	1,66

^a Especificação do fabricante;

^b CV (%), desvio padrão relativo.

5. CONCLUSÕES

Para a quantificação da RAC no complexo vitamínico-mineral adicionado de Ractosuin[®] foi necessário o desenvolvimento e a validação de um método analítico empregando CLAE com coluna de fase reversa Gemini[®] C18.

O método validado utilizou tampão fosfato de sódio monobásico anidro 0,100 mol L⁻¹ pH 7,6 e acetonitrila (74:26, v/v) como fase móvel. A ELL, empregando acetato de etila como solvente extrator, foi utilizada para separar o ativo dos interferentes da matriz. O método desenvolvido foi validado com sucesso, uma vez que se apresentou linear no intervalo de concentração estudado (concentração de 90,00 a 180,00 µg mL⁻¹), com precisão e exatidão aceitáveis, além de atender aos demais parâmetros exigidos em uma validação analítica como: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, estabilidade e robustez.

Os resultados obtidos mostraram que o método validado foi capaz de determinar, com êxito, a porcentagem de RAC presente na amostra de complexo vitamínico-mineral adicionado de Ractosuin[®]. A análise da RAC nesta etapa do processo é fundamental para garantir a homogeneidade do produto que deverá ser adicionado à ração destinada aos suínos em terminação.

Capítulo 3: Desenvolvimento e validação de um método para análise de Ractopamina na ração

1. INTRODUÇÃO

As rações para suínos em terminação devem atender às exigências nutricionais para esta fase de crescimento dos animais combinando ingredientes protéicos e com alto teor de minerais. A ração deve ser a única fonte de energia dos suínos nos 28 dias que antecedem ao abate (disponível em www.embrapa.br).

Desta forma, a alimentação destes animais deve ser baseada em uma mistura de 79% de milho moído, 18,5% de farelo de soja e 2,5% do complexo vitamínico-mineral contendo o Ractosuin®.

O complexo vitamínico-mineral deve ser adicionado à ração na proporção de 950 gramas para 100 quilos de ração, o que corresponde a 10 ppm de RAC na mistura final (disponível em www.ourofino.com).

Esta quantidade de RAC/dia é a permitida pelo FDA e garante um aumento de peso corpóreo de até 40,8 Kg durante o período que antecede ao abate (CARR et al., 2009).

Qualquer erro em uma ou mais etapas do processo de produção das rações pode acarretar em prejuízos econômicos expressivos, já que os gastos com a alimentação correspondem à maior parte do custo de produção dos suínos (disponível em www.embrapa.br).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo foi desenvolver um método analítico para a quantificação de RAC em amostras de ração empregando a CLAE com detector de UV. Para isso, foi necessário o desenvolvimento das seguintes etapas:

- 1 Otimizar as condições para análise da RAC utilizando a CLAE;
 - 2 Desenvolver e validar um método para análise da RAC na ração para suínos em terminação empregando a CLAE;
 - 3 Aplicar o método desenvolvido e validado em laboratórios de controle de qualidade de indústrias veterinárias.
-

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Material*

3.1.1. *Reagentes e solventes empregados no procedimento analítico*

Nas análises por CLAE, foram utilizados acetonitrila grau cromatografia proveniente da J. T. Baker[®] Inc (Phillipsburg, EUA), formiato de amônio obtido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), ácido fórmico, da Synth[®] (Diadema, Brasil) e água purificada adquirida no sistema MILLI-Q PLUS[®] – Millipore / Millipore Corporation (Bedford, EUA). Para o preparo da amostra, utilizou-se acetato de etila, da J. T. Baker e hidróxido de sódio, da Synth[®].

3.1.2. *Soluções-padrão*

Para a validação do método para quantificação de RAC na ração, as soluções-padrão foram preparadas nas concentrações de 6,50, 8,00, 9,60, 10,80, 12,00, 13,20 e 14,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir de uma solução-mãe de 5,00 mg mL^{-1} . Para obtenção desta solução estoque, 125,0 mg de RAC foram pesados em balão volumétrico de 25 mL, solubilizados e diluídos em água.

3.1.3. *Equipamentos*

Para desenvolver e validar o método para análise da RAC em ração foram utilizados equipamentos como: pHmetro Corning[®], modelo 430 (Nova Iorque, EUA), balança analítica Shimadzu[®] Corp (Japão), modelo AW220, agitador vórtex IKA[®] (Janker Kunkel Staufen, Alemanha), concentrador de amostras *Speed Vac* modelo SPD 1010 da Thermo Savant (Minnessota, EUA) e centrífuga Excelsa II Fanem[®], modelo 206 BL (São Paulo, Brasil).

O desenvolvimento do método foi realizado no cromatógrafo a líquido Shimadzu[®] (Kyoto, Japão), composto por bomba modelo LC-20AT, detector de arranjo de diodos modelo SPD-M20A, forno modelo CTO-20 A, injetor automático modelo SIL-20AC_{HT}, controlador modelo CBM-20A e software Solutions Shimadzu[®] (Kyoto, Japão).

A validação do método e as análises posteriores foram feitas no cromatógrafo a líquido Shimadzu[®] (Kyoto, Japão), composto por bomba modelo LC-

20AT, detector por absorção no UV-Visível modelo SPD-20A, forno modelo CTO-20 A, injetor automático modelo SIL-20A e software Solutions Shimadzu® (Kyoto, Japão).

Foi empregada coluna cromatográfica C18 Gemini® (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), Torrance, CA, USA) Phenomenex® protegida com uma coluna de guarda C18 Phenomenex® (4,0 mm x 3,0 mm x 5 μ m).

3.2. Métodos

3.2.1. Otimização das condições cromatográficas para a análise de RAC

Para análise de RAC na ração, foi utilizada uma concentração de trabalho de 12,00 μ g mL⁻¹ de RAC. Foram injetados 20 μ L da solução em CLAE/UV a uma temperatura de forno de 40 °C. As condições de análise foram definidas injetando-se a solução-padrão de RAC, a amostra extraída do placebo e da ração na concentração final de 12,00 μ g mL⁻¹.

Os parâmetros resolução (R_s), fator de retenção (k), fator de separação (α) e número de pratos teóricos (N) foram avaliados a cada separação cromatográfica realizada.

3.2.2. Procedimento de preparação da amostra da ração

A amostra da ração contendo 79% de milho moído, 18,5% de farelo de soja e 2,5% de complexo vitamínico-mineral previamente misturado com o Ractosuin® (nas proporções descritas no capítulo 2), foi primeiramente triturada em gral de porcelana. Feito isso, 5000,0 mg da ração (3950,0 mg de milho moído, 925,0 mg de farelo de soja e 125,0 mg de complexo vitamínico-mineral acrescido de Ractosuin®) foram pesadas em um erlenmeyer de 125mL com tampa e 25 mL de água foram adicionados volumetricamente. A amostra foi levada ao banho de ultrassom por 20 minutos e agitada em vórtex por 5 minutos. Em seguida, esta amostra foi centrifugada por 5 minutos a 3000 $\times$ g. Alíquotas de 4 mL deste centrifugado foram colocadas em tubos juntamente com 400 μ L de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹ e 5 mL de acetato de etila. A amostra foi agitada em vórtex por 4 minutos e novamente centrifugada a 3000 $\times$ g por 5 minutos a fim de separar a fase

aquosa da orgânica. O próximo passo foi recolher 3 mL da fase orgânica e evaporar em concentrador de amostras *Speed Vac* a uma temperatura de 35 °C. O resíduo seco foi ressuspendido com uma mistura de 400 µL de água e 400 µL de clorofórmio. A amostra foi agitada em vórtex por 2 minutos e centrifugada por 1 minuto. O sobrenadante foi recolhido e uma alíquota de 20 µL da solução final contendo 12,00 µg mL⁻¹ de RAC (considerando que a ração contém 0,001% de RAC) foi injetada e analisada por CLAE/UV.

O placebo (PLAC 3), utilizado na validação da RAC na ração, foi constituído de uma mistura de 79% de milho moído, 18,5% de farelo de soja e 2,5% de complexo vitamínico-mineral.

A amostra do PLAC 3 foi preparada da mesma forma que a amostra da ração descrita anteriormente. Desta forma, para a extração do PLAC 3, foi necessária uma amostragem de 5000,0 mg, ou seja, foram pesados 3950,0 mg de milho moído, 925,0 mg de farelo de soja e 125,0 mg de complexo vitamínico-mineral.

3.2.3. Validação do método analítico

A validação do método seguiu os mesmos procedimentos adotados nos Capítulos 1 e 2, avaliando-se os parâmetros: *system suitability*, seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, estabilidade e robustez.

3.2.3.1. System Suitability

Para verificar o desempenho do sistema, foram injetadas 5 vezes a mesma solução-padrão contendo 12,00 µg mL⁻¹ de RAC. A cada corrida cromatográfica foram verificados os seguintes parâmetros: tempo de retenção, área, número de pratos teóricos, fator de simetria e resolução.

3.2.3.2. Estudo de seletividade

A seletividade do método foi comprovada analisando o PLAC 3 para verificação de possíveis interferentes que poderiam influenciar na quantificação da RAC.

3.2.3.3. Linearidade

A linearidade foi avaliada através da construção de 3 curvas analíticas com adição do analito à matriz (PLAC 3), em 7 níveis de concentração ($n = 3$) no intervalo de 6,50 a 14,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (6,50, 8,00, 9,60, 10,80, 12,00, 13,20 e 14,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Foram preparadas 3 soluções-mãe de RAC (5,00 mg mL^{-1}) para a construção das curvas analíticas. Em balão volumétrico de 25 mL, foram pesados 125 mg de RAC, solubilizados e diluídos com água. Para obtenção de cada ponto da curva analítica, foram aliquotadas quantidades conhecidas de cada solução-mãe de RAC (**Tabela C3-1**) e solubilizadas em balão volumétrico de 10 mL com água. Em um erlenmeyer de 125 mL, alíquotas de 125 μL das soluções preparadas anteriormente foram adicionadas a 5000,0 mg do PLAC 3 previamente pesado e seguiu-se o processo de extração e análise conforme descrito no item 3.2.2.

Tabela C3-1: Concentração final dos padrões de RAC na validação da ração.

Pontos da Curva Analítica	Concentração Final dos Padrões ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume de solução mãe (μL) adicionado em balão volumétrico de 10 mL
1	6,50	433
2	8,00	533
3	9,60	640
4	10,80	720
5	12,00	800
6	13,20	880
7	14,40	960

3.2.3.4. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

A determinação do LD e do LQ foi realizada utilizando amostras de PLAC 3 enriquecidas com concentrações de RAC variando de 3,00 a 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e extraídas conforme o item 3.2.2. Para cada concentração, foram analisadas 2 replicatas e para a concentração considerada como LQ foram analisadas 6 replicatas. Considerou-se como LD a menor concentração correspondente a uma relação sinal/ ruído = 3 e como LQ a menor concentração quantificada com relação sinal/ ruído = 10 e coeficiente de variação menor que 10%.

3.2.3.5. *Precisão e exatidão*

Para a determinação dos parâmetros de precisão (intra e interensaios) e exatidão (intra e interensaios), foram utilizadas amostras de PLAC 3 fortificadas com o padrão de RAC.

A repetibilidade foi avaliada em triplicata e em 3 diferentes concentrações (9,60, 12,00 e 14,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária também foi avaliada em triplicata e nas mesmas concentrações descritas acima, mas em 3 dias diferentes (interensaios).

A exatidão foi avaliada pela aplicação do método de análise proposto a uma mistura do PLAC 3 com quantidades conhecidas de RAC, para obter concentrações de 9,60, 12,00 e 14,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, equivalentes a 80, 100 e 120% da concentração de trabalho.

As amostras utilizadas para avaliação destes parâmetros foram preparadas de forma semelhante à descrita no item 3.2.3.3.

Os cálculos para se obter os valores da precisão e exatidão foram baseados em uma curva padrão no intervalo de concentração de 6,50 a 14,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.2.3.6. *Recuperação*

A recuperação do método foi avaliada de acordo com o procedimento descrito nos esquemas das **Figuras C3-1** e **C3-2**, ou seja, as soluções-padrão foram adicionadas antes e depois de realizar a partição das fases aquosa e orgânica.

O cálculo da porcentagem de ativo recuperado depois do processo de extração foi baseado em uma curva analítica construída adicionando a RAC após o procedimento de extração do PLAC 3 (**Figura C3-1**).

Figura C3-1. Esquema do procedimento de preparo de amostra para o ensaio de recuperação: adição das soluções-padrão depois da partição (concentrações reais).

Figura C3-2. Esquema do procedimento de preparo de amostra para o ensaio de recuperação: adição das soluções-padrão antes da partição (concentrações obtidas).

As análises foram realizadas em triplicata para cada concentração. Os resultados foram obtidos comparando-se as áreas dos picos das concentrações reais (o analito foi adicionado no final do processo) e obtidas (o analito passou por todo processo de extração).

3.2.3.7. *Estudo de estabilidade*

Para o estudo de estabilidade da RAC foram analisadas amostras ($n = 6$) em uma concentração baixa ($9,60 \mu\text{g mL}^{-1}$) e outra alta ($14,40 \mu\text{g mL}^{-1}$). As condições de estabilidade avaliadas foram as mesmas descritas no item 3.2.3.7 do capítulo 2.

Os resultados (áreas) foram comparados com aqueles obtidos das análises das amostras frescas. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do teste *One-way ANOVA* (Origin[®] 7, Northampton, EUA). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

3.2.3.8. *Estudo de robustez*

O estudo de robustez do método foi realizado com soluções-padrão de RAC e amostras de ração. Os parâmetros avaliados, através do *Box-Behnken Design*, foram uma variação de $\pm 2\%$ na temperatura da coluna, na vazão da fase móvel e na porcentagem de acetonitrila na fase móvel, tendo por base o método original.

Os fatores de resposta foram as concentrações de RAC nas soluções-padrão e nas amostras e foram interpretados utilizando unidades codificadas pela aplicação de um modelo quadrático completo. Foram determinados os coeficientes de regressão e os valores de probabilidade associados (*p-value*) nas soluções-padrão de RAC e nas amostras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *Otimização das condições cromatográficas para análise da RAC*

Neste subitem, serão apresentadas as principais modificações cromatográficas realizadas durante o desenvolvimento do método para análise da RAC na ração. Paralelamente às injeções do padrão de RAC, foram analisadas amostras da ração e do PLAC 3 extraídas através de ELL.

O desenvolvimento do método analítico foi realizado no cromatógrafo com detector de arranjo de diodos, uma vez que com este tipo de detector é possível observar em qual comprimento de onda os interferentes do PLAC 3 têm menor absorção.

Primeiramente, foram avaliadas as mesmas condições cromatográficas e de preparo de amostra do método de análise da RAC no complexo vitamínico-mineral (Capítulo 2). Este método utilizou tampão fosfato de sódio monobásico anidro 0,1 mol L⁻¹ pH 7,6; acetonitrila (74: 26, v/v) como fase móvel, vazão de 1,1 mL min⁻¹, forno a 40 °C, detecção em 275 nm e coluna Gemini C18 Phenomenex® (250 mm x 4,6 mm x 5 µm). Através da ELL tentou-se extrair o ativo da amostra, usando como solvente extrator o acetato de etila. Para análise da ração, esta condição cromatográfica apresentou interferência dos constituintes do PLAC 3 no tempo de retenção da RAC.

Outra opção foi alterar o solvente do procedimento da extração de acetato de etila para hexano. As demais condições cromatográficas foram mantidas conforme descritas no primeiro experimento citado. Esta condição também não foi satisfatória, uma vez que este solvente não conseguiu extrair a RAC da ração.

A outra condição avaliada seguiu os mesmos parâmetros cromatográficos e de preparo de amostra do primeiro experimento, com exceção do comprimento de onda, que foi alterado para 223 nm devido à menor interferência do PLAC 3. Isto foi verificado através do detector de arranjo de diodos.

Visando eliminar a interferência do PLAC 3, foram mantidas as mesmas condições cromatográficas descritas acima, mas o modo de preparo da amostra foi modificado. Foi utilizado acetato de etila como solvente extrator e, no final do procedimento de extração foi necessário fazer uma nova partição do analito,

ou seja, as amostras foram ressuspensas com uma mistura de água: clorofórmio (1:1).

Utilizando o procedimento de extração descrito acima, foi possível extrair RAC da ração, mas ainda assim existiam interferentes no mesmo tempo de retenção do analito. Visando a diminuição de ruídos no início da análise e o fim da interferência do PLAC 3, o desenvolvimento do método prosseguiu tentando-se mudar o tipo de sal e o pH do tampão de análise,.

O próximo experimento utilizou fase móvel composta por tampão formiato de amônio $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado para 4,0 e acetonitrila na proporção de 74: 26 (v/v), vazão de $1,1 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna a 40°C e detecção em 223 nm. A ELL foi feita com acetato de etila e as amostras foram ressuspensas com uma mistura de água: clorofórmio (1:1). Com esta condição cromatográfica conseguiu-se eliminar uma grande parte dos ruídos da linha de base existentes no início do cromatograma, mas ainda não foi possível eliminar a interferência do PLAC 3.

Alguns ajustes no pH e na proporção dos constituintes da fase móvel ainda foram necessários para diminuir a interferência do PLAC 3.

As condições de análise foram definidas da seguinte forma: tampão formiato de amônio $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,0: acetonitrila (80: 20, v/v) como fase móvel, vazão de $1,1 \text{ mL min}^{-1}$, forno da coluna a 40°C e detecção em 223 nm (**Tabela C3-2**). As condições de preparo de amostra estão descritas no item 3.2.2 deste capítulo.

Tabela C3-2. Condições cromatográficas para determinação de RAC na ração.

Condições	Método Otimizado
Equipamento	CLAE Shimadzu [®]
Fase móvel	Tampão formiato de amônio $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,0: acetonitrila (80: 20, v/v)
Coluna	Coluna Gemini C18 Phenomenex [®] (250 mm x 4,6 mm x 5 μm)
Coluna de guarda	Coluna de guarda C18 Phenomenex [®] (4,0 mm x 3,0 mm x 5 μm)
Comprimento de onda	223nm
Vazão	$1,1 \text{ mL min}^{-1}$
Volume de injeção	20 μL
Temperatura	40°C
Tempo de retenção	4,30 minutos

As Figuras C3-3 e C3-4 mostram, respectivamente, os cromatogramas do padrão adicionado ao PLAC 3 e o cromatograma do PLAC 3 nas condições experimentais descritas acima.

Figura C3-3. Cromatograma referente ao padrão de RAC adicionado ao PLAC 3. Condições cromatográficas: coluna C18 Phenomenex® Gemini (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), coluna de guarda C18 Phenomenex® (4,0 mm x 3,0 mm x 5 μ m); fase móvel: tampão formiato de amônio 0,02 mol L⁻¹ pH 3,0; acetonitrila (80: 20, v/v); vazão de 1,1 mL min⁻¹ e detecção em 223 nm.

Figura C3-4. Cromatograma referente ao PLAC 3. Condições cromatográficas: coluna C18 Phenomenex® Gemini (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), coluna de guarda C18 Phenomenex® (4,0 mm x 3,0 mm x 5 μ m); fase móvel: tampão formiato de amônio 0,02 mol L⁻¹ pH 3,0; acetonitrila (80: 20, v/v); vazão de 1,1 mL min⁻¹ e detecção em 223 nm.

4.2. Validação do método analítico desenvolvido

4.2.1. System suitability

O *system suitability* foi realizado antes de cada dia de validação. Foram feitas cinco injeções de solução-padrão e os seguintes parâmetros foram avaliados: assimetria, número de pratos teóricos, resolução e coeficiente de variação (CV) da área do pico e tempo de retenção.

A **Tabela C3-3** mostra a performance do sistema durante os três dias de validação e os valores recomendados para cada parâmetro avaliado segundo a USP 32 (2009) e o fabricante da coluna utilizada. Para todas as injeções do *system suitability*, a assimetria foi menor que 2,0, o número de pratos teóricos foi maior que 4000 e CV(%) da área do pico e do tempo de retenção foram menores que 2,0%.

Tabela C3-3. Resultados do *system suitability* da RAC na validação da ração.

Parâmetros	Recomendações	Dia	Mínimo	Máximo	CV (%) ^a
Tempo de retenção	CV (%) ^b < 2	Dia 1	4,339	4,376	0,30
		Dia 2	4,096	4,102	0,06
		Dia 3	4,156	4,170	0,13
Área	CV (%) ^b < 2	Dia 1	364548	379979	1,49
		Dia 2	370482	385628	1,68
		Dia 3	360798	380049	1,98
Pratos Teóricos	Valores > 2000	Dia 1	4636,7	4856,8	1,95
		Dia 2	4592,2	4751,9	1,40
		Dia 3	4414,5	4499,7	0,81
Assimetria	Valores < 2	Dia 1	1,122	1,139	0,64
		Dia 2	1,204	1,256	1,55
		Dia 3	1,260	1,311	1,57

^a Valores de 5 replicatas;

^b CV(%), desvio padrão relativo expresso em porcentagem.

4.2.2. Estudo de seletividade

Após otimizar as condições cromatográficas e de preparo de amostras para análise da RAC na ração, o PLAC 3 foi submetido ao processo de extração (item 3.2.2.) e analisado por CLAE para identificação de possíveis interferentes e/ou produtos de degradação (**Figura C3-4**).

A **Figura C3-5** apresenta um cromatograma da análise da ração contendo o complexo vitamínico-mineral adicionado de Ractosuin[®], sendo possível visualizar o pico da RAC e alguns interferentes que eluem próximo ao seu tempo de retenção, mas que não influenciam na quantificação da RAC. A **Tabela C3-4** mostra a resolução, o fator de retenção, o fator de separação e o número de pratos teóricos obtidos para a RAC na ração.

Figura C3-5. Cromatograma referente à separação da RAC na ração e seus interferentes adjacentes. (1) Interferente A, (2) RAC e (3) Interferente B. Condições cromatográficas: coluna C18 Phenomenex[®] Gemini (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), coluna de guarda C18 Phenomenex[®] (4,0 mm x 3,0 mm x 5 μ m); fase móvel: tampão formiato de amônio 0,02 mol L⁻¹ pH 3,0; acetonitrila (80: 20, v/v); vazão de 1,1 mL min⁻¹ e detecção em 223 nm.

Tabela C3-4. Parâmetros cromatográficos obtidos para a RAC na ração.

Parâmetros	Dia	Interferente A	RAC	Interferente B
R_s^a	Dia 1	-	2,51	2,07
	Dia 2	-	2,57	2,10
	Dia 3	-	2,75	2,14
k^b	Dia 1	0,76	1,15	1,29
	Dia 2	0,71	1,05	1,33
	Dia 3	0,71	1,05	1,29
α^c	Dia 1	-	1,51	1,12
	Dia 2	-	1,48	1,26
	Dia 3	-	1,48	1,23
N^d	Dia 1	5041	4715	5635
	Dia 2	5260	4548	5458
	Dia 3	5170	4269	5278

^a R_s , resolução;^b k , fator de retenção para o primeiro pico eluído ($t_m = 2,0$ min, definido como um distúrbio significativo na linha de base, correspondendo ao tempo de retenção do soluto não retido);^c α , fator de separação;^d N , pratos teóricos.

4.2.3. Linearidade

Para a análise da RAC na ração, foram feitas curvas analíticas na matriz (PLAC 3) e fortificadas com concentrações conhecidas de RAC no intervalo de concentração de 6,50 a 14,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A equação da curva analítica, coeficiente de determinação e regressão para análise do PLAC 3 fortificado com RAC estão representados na **Figura C3-6**.

Figura C3-6. Curva analítica demonstrando o coeficiente de determinação e de correlação para o PLAC 3 fortificado com RAC no intervalo de concentração de 6,50 a 14,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.4. Limite de detecção e quantificação

O LD foi determinado como a menor concentração correspondente a uma relação sinal/ruído = 3 e o LQ como a menor concentração quantificada com relação sinal/ruído = 10 e coeficiente de variação menor que 10%. No método de análise da RAC na ração, a menor concentração detectável foi de $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a menor concentração quantificável foi de $4,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.5. Precisão e exatidão

Para verificar a precisão do método analítico foram empregadas as seguintes concentrações de RAC: 9,60, 12,00 e $14,40 \mu\text{g mL}^{-1}$. Pode-se verificar que os coeficientes de variação, para as três concentrações analisadas, apresentaram-se entre 3,93 e 9,69% (intraensaio) e entre 6,75 e 8,59% (interensaio) para o PLAC 3 fortificado com RAC. Os valores referentes à precisão intra e interensaios para a análise do PLAC 3 fortificado com RAC encontram-se descritos na **Tabela C3-5**.

Tabela C3-5. Precisão do método para análise da RAC na ração.

RAC		Dia	PLAC 3 fortificado		
Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			9,60	12,00	14,40
Intraensaio					
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Dia 1	9,37	11,74	13,84	
	Dia 2	9,01	11,05	12,99	
	Dia 3	9,05	11,15	13,31	
Precisão (CV, %) ^a	Dia 1	3,93	5,41	6,29	
	Dia 2	8,62	7,41	9,37	
	Dia 3	7,95	6,77	9,69	
Interensaio					
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			9,14	11,31	13,38
Precisão (CV, %) ^a			6,89	6,75	8,59

^a CV(%): coeficiente de variação expresso em porcentagem.

As determinações da exatidão intra e interensaios também foram feitas utilizando os dados obtidos do estudo da precisão. Pode-se notar que a exatidão variou de 90,22 a 97,86% (intraensaio) e de 92,93 a 95,22% (interensaio) para o PLAC 3 fortificado com RAC.

Os valores referentes à exatidão intra e interensaios para a análise do PLAC 3 fortificado com RAC encontram-se descritos na **Tabela C3-6**.

Tabela C3-6. Exatidão do método analítico validado para análise da RAC na ração.

RAC		Dia		PLAC 3 fortificado	
Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			9,60	12,00	14,40
Intraensaio					
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Dia 1	9,37	11,74	13,84	
	Dia 2	9,01	11,05	12,99	
	Dia 3	9,05	11,15	13,31	
Exatidão (%)	Dia 1	97,60	97,86	96,12	
	Dia 2	93,82	92,05	90,22	
	Dia 3	94,22	92,95	92,46	
Interensaio					
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		9,14	11,31	13,38	
Exatidão (%)		95,21	94,29	92,93	

De acordo com AOAC (1993), os valores obtidos para precisão (CVs inferiores a 11%) e exatidão (entre 80-110%) no método validado para análise da ração são aceitáveis para a realização das análises na faixa de concentração analisada.

4.2.6. Recuperação

Na **Tabela C3-7** encontram-se os resultados referentes à recuperação da RAC na ração. Através dos dados obtidos, pode-se verificar que a recuperação ficou em torno de 84%.

Tabela C3-7. Recuperação (R%) do método de análise da RAC na ração.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RAC	
	R (%)	CV(%)
9,60	84,27	7,27
12,00	85,99	2,90
14,40	83,36	1,45
Médias	84,54	4,20

4.2.7. Estudo de estabilidade

As áreas da RAC na ração, sob a influência de ciclos de congelamento/descongelamento, congelamento por 48 horas e bancada por 12 horas foram comparadas com as áreas das amostras recém-preparadas. A **Tabela C3-8** mostra a porcentagem de RAC encontrada após cada ciclo em estudo para concentrações de 9,60 e 14,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores dos coeficientes de variação foram menores do que 5,00%.

Tabela C3-8. Teste de estabilidade da RAC na ração.

Concentração Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RAC	
	<i>p-value</i>	CV ^b (%)
12 horas Temperatura Ambiente^a		
9,60	0,82	3,32
14,40	0,29	2,14
Ciclos de Congelamento e Descongelamento^a		
9,60	0,23	4,45
14,40	0,37	3,58
48 horas Congelamento^a		
9,60	0,16	4,28
14,40	0,11	3,72

^a $n = 6$: n , número de replicatas;

^b CV, coeficiente de variação expresso em porcentagem.

Os estudos de estabilidade evidenciaram valores estatisticamente semelhantes aos das amostras frescas; comprovando que a RAC é estável quando submetida a diferentes condições de análise.

4.2.8 Estudo de robustez

Os resultados obtidos (**Tabela C3-9**) demonstraram que o método analítico foi robusto, uma vez que as variações dos parâmetros experimentais não produziram efeitos estatisticamente significativos na concentração da solução padrão e da amostra.

A **Tabela C3-10** apresenta os coeficientes de regressão e os respectivos valores de probabilidade (*p-value*) das respostas da RAC na solução padrão e na amostra. De acordo com os resultados obtidos, pôde-se observar que

as variações dos parâmetros não foram estatisticamente significativas nem na análise da solução padrão e nem na amostra, uma vez que todos os valores apresentaram $p > 0,05$.

Tabela C3-9. Parâmetros experimentais e valores de respostas para a robustez do método da razão usando *Box-Behnken Design*.

Corrida	Vazão (mL min ⁻¹)	Temp. (°C)	% ACN na Fase Móvel	Conc. Solução Padrão (µg mL ⁻¹)	Conc. Amostra (µg mL ⁻¹)
1*	1,10	40	20,0	12,89	11,80
2	1,08	41	20,0	12,77	11,95
3	1,12	40	20,4	12,33	12,11
4	1,12	41	20,0	12,58	11,54
5*	1,10	40	20,0	11,37	12,43
6	1,10	39	20,4	11,13	11,66
7	1,12	40	19,6	12,61	12,79
8	1,08	39	20,0	12,17	11,07
9	1,08	40	20,4	12,52	11,73
10	1,08	40	19,6	12,38	12,34
11	1,10	41	19,6	12,29	11,98
12	1,10	39	19,6	11,77	11,46
13*	1,10	40	20,0	11,02	13,07
14	1,12	39	20,0	12,30	12,45
15	1,10	41	20,4	12,36	12,05

*Pontos centrais.

Tabela C3-10. Coeficientes de regressão e valores de probabilidade associados (p -value) para a resposta das concentrações da solução padrão de RAC e da amostra de razão.

Termo	Concentrações das Soluções Padrão		Concentrações das Amostras	
	Coeficiente	p -value ^a	Coeficiente	p -value ^a
Constante	11,762	0,000	12,4313	0,000
Vazão	-0,0021	0,993	0,2248	0,252
Temperatura	0,3295	0,210	0,1106	0,554
Fase Móvel (%ACN)	-0,0874	0,719	-0,1279	0,496
Vazão x Vazão	0,6332	0,119	-0,1109	0,684
Temperatura x Temperatura	0,0615	0,863	-0,5652	0,079
Fase Móvel x Fase Móvel	0,0667	0,851	-0,0772	0,776
Vazão x Temperatura	-0,0795	0,816	-0,4473	0,130
Vazão x Fase Móvel	-0,1048	0,760	-0,0153	0,953
Temperatura x Fase Móvel	0,1775	0,607	-0,0330	0,899

^aConsiderando p - value < 0,05.

4.3. Aplicação do método

O método validado foi aplicado em amostras reais de ração contendo o complexo vitamínico-mineral com o Ractosuín[®]. Foram coletadas amostras das partes inferior, central e superior da embalagem da ração a fim de se avaliar a homogeneidade do produto. Os resultados obtidos apresentaram precisão satisfatória e se mostraram de acordo com as especificações do fabricante (**Tabela C3-11**).

Tabela C3-11. Determinação de RAC em amostras de ração.

Amostras	Ração (0,00100 %RAC) ^a	
	% RAC encontrada (g RAC/100g Ração)	CV(%) ^b
Superior 1	0,00097	2,76
Superior 2	0,00093	
Superior 3	0,00098	
Meio 1	0,00100	4,31
Meio 2	0,00098	
Meio 3	0,00092	
Inferior 1	0,00103	1,46
Inferior 2	0,00106	
Inferior 3	0,00104	
Média	0,00099	4,82

^a Especificação do fabricante;

^b CV (%), desvio padrão relativo.

5. CONCLUSÕES

Para análise da RAC na ração, foi desenvolvido e validado um método analítico empregando ELL e CLAE.

As condições cromatográficas definidas foram: tampão formiato de amônio 0,02 mol L⁻¹ pH 3,0 e acetonitrila (80: 20, v/v) como fase móvel, vazão de 1,1 mL min⁻¹, temperatura do forno a 40°C e detecção em 223 nm. A ELL, empregando acetato de etila como solvente extrator, foi utilizada para extrair o ativo dos interferentes da matriz.

O método validado atendeu aos parâmetros exigidos em relação à seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão, estabilidade e robustez.

De acordo com os resultados obtidos na aplicação do método validado em amostras reais de ração, pode-se concluir que o método é capaz de quantificar, com sucesso, a porcentagem de RAC presente na ração.

A análise da RAC nesta etapa do processo é fundamental para garantir a homogeneidade do produto final que servirá como fonte exclusiva de nutrição aos suínos nos 28 dias que antecedem ao abate.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

A técnica de análise, empregando CLAE e colunas de fase reversa, apresentada neste estudo foi eficiente para identificar e quantificar a RAC presente na matéria-prima, no produto acabado Ractosuin[®], no complexo vitamínico-mineral e na ração.

Os métodos desenvolvidos e validados apresentaram características de desempenho adequadas, tais como seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão, estabilidade e robustez.

Para a análise da RAC em amostras de matéria-prima e do produto acabado Ractosuin[®], foi possível desenvolver um método cromatográfico que permitiu a análise de um grande número de amostras em um tempo relativamente curto.

Os resultados obtidos nas análises do complexo vitamínico-mineral, empregando a ELL, mostraram que o método foi capaz de determinar a quantidade de RAC presente nesta etapa do processo. A análise da RAC no complexo vitamínico-mineral é importante para garantir a homogeneidade do produto que deverá ser adicionado à ração destinada aos suínos em terminação.

Análises de amostras de ração enriquecidas com o complexo de vitaminas e minerais contendo o produto Ractosuin[®] demonstraram que o método de análise descrito no Capítulo 3 foi capaz de quantificar, com sucesso, a RAC presente na ração. O emprego da ELL foi eficiente para extrair o ativo de uma matriz bastante complexa com pequena porcentagem de RAC.

A análise gradual da RAC em todas as etapas descritas (matéria-prima, Ractosuin[®], complexo vitamínico-mineral e ração) é de suma importância para assegurar a qualidade do produto final.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS

- AALHUS, J.L.; SCHAEFER, A.L.; MURRAY, A.C.; JONES, S.D.M. The effect of ractopamine on myofibre distribution and morphology and their relation to meat quality in swine. **Meat Sci.**, v.31, p.397-409, 1992.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), **Resolução RDC 33**, de 25/02/2003.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), **Resolução RE nº 899**, de 29/05/2003.
- ANDERSON, D.B.; VEENHUIZEN, W.P.; WAITT, W.P. The effect of dietary protein on nitrogen metabolism, growth performance and carcass composition of finishing pigs fed ractopamine. **Fed. Proc.** V.46, p.1021, 1987.
- AOAC Peer Verified methods Program, Manual on polices and procedures, Arlington, VA, 1993.
- ASATO, G.; BAKER, P.; BASS, R.; BENTLEY, T.; CHARI, S.; DALRYMPLE, R.; FRANCE, D.; GINGHER, P.; LENCES, B.; PASCAVAGE, J.; PENSACK, J.; RICKS, C. Repartitioning agents: 5-[11-Hydroxy-2-(isopropylamino)ethyl]-anthranilonitrile and related phenethanolamines; agents for promoting growth, increasing muscle accretion and reducing fat deposition in meat producing animals. **Agric. Biol. Chem.**, v.48, p.2883-2888, 1984.
- BARK, L.I.; STABLY, T.S.; CROMWELL, O.L.; MIYAT, J.A. Influence of genetic capacity for lean tissue growth on rate and efficiency of tissue accretion in pigs fed ractopamine. **J. Anim. Sci.**, v.70, p.3391-3400, 1992.
- BLANCA, J.; MUNOZ, P.; MORGADO, M.; MÉNDEZ, N.; ARANDA, A.; REUVERS, T.; HOOGHUIS H. Determination of clenbuterol, ractopamine and zilpaterol in liver and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v.529, p.199-205, 2005.
- CARR, S. N.; HAMILTON, D. N.; MILLER, K. D.; SCHROEDER, A. L.; FERNANDEZ-DUEÑAS, D.; KILLEFER, J.; ELLIS, M.; McKEITH, F.K. The effect of ractopamine hydrochloride (Paylean®) on lean carcass yields and pork quality characteristics of heavy pigs fed normal and amino acid fortified diets. **Meat Sci.**, v.81, p.533-539, 2009.
-

- CAUSON, R. Validation of Chromatography methods in biomedical analysis Viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.689, p.175-80, 1997.
- CHURCHWELL, M.I.; HOLDER, C.L.; LITTLE, D.; PREECE, S.; SMITH, D.J., DOERGE, D.R. Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometric analysis of incurred ractopamine residues in livestock tissues. Rapid Commun. **Mass Spectrom.**, v.16, p.1261-1265, 2002.
- DALIDOWICZ, J.D. (1986a). Metabolism of ¹⁴C-ractopamine HCl in the rat. Unpublished Report No. ABC-0285 from Lilly Research Laboratories, Division of Eli Lilly and Company, Greenfield, Indiana, USA. Submitted to WHO by Elanco Products Company, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.
- DALIDOWICZ, J.D. (1986b). Metabolism of ¹⁴C-ractopamine HCl in the dog. Unpublished Report No. ABC-0301 from Lilly Research Laboratories, Division of Eli Lilly and Company, Greenfield, Indiana, USA. Submitted to WHO by Elanco Products Company, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.
- DALIDOWICZ, J.E.; BABBITT, M.S. (1986) Characterization of ¹⁴C-residues in tissues and excreta from swine fed ¹⁴C-ractopamine HCl. Unpublished report on study No. ABC-0355 Agricultural Biochemistry, Lilly Research Laboratories, Division of Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.
- DALIDOWICZ, J.E.; THOMSON, T.D.; HERBERG, R.J. (1986) ¹⁴C-Ractopamine HCl balance/excretion study in swine. Unpublished report on study No. ABC-0330 from Agricultural Biochemistry, Lilly Research Laboratories, Division of Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.
- DOS RAMOS, F. J. β -Agonist extraction procedures for chromatographic analysis. **J. Chromatogr. A**, v.880, p.69-83, 2000.
- DUNSHEA, F.R.; KING, R.H.; EASON, P.J.; CAMPBELL, R.G. Interrelationships between dietary ractopamine, energy intake, and sex in pigs. Aust. **J. Agric. Rev.**, v.49, p.565-574, 1998.
-

- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Disponível em: www.embrapa.br. Acesso em 20 de fevereiro de 2010.
- ENGESETH, N.J.; LEE, K.-O.; BERGEN, W.G.; HELFERICH, W.G.; KNUDSON, B.K.; MERKEL, R.A. Fatty acid profiles of lipid depots and cholesterol concentration in muscle tissue of finishing pigs fed ractopamine. **J. Food Sci.**, v.57, p.1060-1062, 1992.
- FDA, 2001. United States Food and Drug Administration (US-FDA); *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, 2001.
- FIORI, M.; CIVITAREALE, C.; MIRANTE, S.; MAGARÓ, E.; BRAMBILLA, G., Evaluation of two different clean-up steps, to minimise ion suppression phenomena in ion trap liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the multi-residue analysis of beta agonists in calves urine. **Anal. Chim. Acta**, v.529, p.207-210, 2005.
- GIL; ORLANDO; MATIAS; SERRANO. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 1ed, Campo Grande, p. 55-70, 2005.
- HAESE, D.; BÜNZEN, S. Ractopamina, Rev. Eletr. Nutritime, v.2, p.176-182, 2005. Disponível em: <<http://www.nutritime.com.br>>. Acesso em 15 de julho de 2008.
- HANRAHN, J.P. Beta-agonists and Their Effects On Animal Growth and Carcass Quality, Elsevier, London, 1987.
- HE, L.; SU, Y.; ZENG, Z.; LIU, Y.; HUANG, X. Determination of ractopamine and clenbuterol in feeds by gas chromatography–mass spectrometry. **Anim. Feed Sci. Techn.**, v.132, p.316-323, 2007.
- ICH (International Conference on Harmonization) Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical methods text and methodology Q2(R1). In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2005.
- INKSTER, J.; HOVELL, F.; KYLE, D.; BROWN, D.; LOBLEY, G. The effect of clenbuterol on basal protein turnover and endogenous nitrogen loss of sheep. Br. **J. Nutr.**, v.62, p.285-296, 1989.
-

- INOUE, T.; CHANG, J.P. Capillary electrophoretic separation and quantitation of ractopamine stereoisomers using cyclDextrins as chiral additives. **J. Liquid Chromatogr. & Rel. Technol.**, v.26, p.1677-1693, 2003.
- LEHNER, A.F.; HUGHES, C.G.; HARKINS, J.D.; NICKERSON, C.; MOLLETT, B.; DIRIKOLU, L.; BOSKEN, J.; CAMARGO, F.; BOYLES, J.; TROPPEMANN, A.; KARPIESIUKE, W.; WOODS, W.E.; TOBIN, T. Detection and confirmation of ractopamine and its metabolites in horse urine after Paylean® administration. **J. Anal. Toxicol.**, v.28, p.226-237, 2004.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Principles of Biochemistry, 4^a Edition, W. H. Freeman & Co (Ed.), 2004.
- LIU, C.Y.; GRANT, A.L.; KIM, K.H.; JI, S.Q.; HANCOCK, D.L.; ANDERSON, D.B.; MILLS, S.E. Limitations of ractopamine to affect adipose tissue metabolism in swine. **J. Anim. Sci.**, v.72, p.62-67, 1994.
- MARCHANT-FORDE, J.N., LAY JR., D.C., PAJOR, E.A., RICHERT, B.T., SCHINCKEL, A.P. The effects of ractopamine on behavior and physiology of finishing pigs. **J. Anim. Sci.**, v.81, p.416-422, 2003.
- MERSMANN, H.J. Acute metabolic effects of adrenergic agents in swine. **Am. J. Physiol.** v.252 (Endocrinol. Metab. 15), p.E85- E95, 1987.
- MILLS, S.E., KISSEL, J.; BIDWELL, C.A.; SMITH, D.J. Stereoselectivity of porcine β -adrenergic receptors for ractopamine stereoisomers. **J. Anim. Sci.**, v.81, p.122–129, 2003.
- MILLS, S.E.; SPURLOCK, M.E.; SMITH, D.J. Beta-adrenergic subtypes that mediate ractopamine stimulation of lipolysis. **J. Anim. Sci.**, v.81, p.662-668, 2003.
- MOODY, D.E., HANCOCK, D.L., ANDERSON, D.B. Phenethanolamine repartitioning agents. In: Mello, J.P.F.D. (Ed.). Farm animal metabolism and nutrition. New York: CAB, p.65-95, 2000.
- MORAGUES, F.; IGUALADA, C. How to decrease ion suppression in a multiresidue determination of β -agonists spectrometry with ion – trap detector. **Anal. Chim. Acta**, v.637, p.193-195, 2009.
-

- O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P. E.; OBENCHAIN JR, J. R., GALLIPEAU, J. A. R.; D'ARECCA, M. A. **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 13ed, Merck & Co., Inc., 2001.
- OUROFINO AGRONEGÓCIO. Disponível em: www.ourofino.com Acesso em 02 de novembro de 2009.
- PAGE, K.A.; HARTZELL, D.L.; LI, C.; WESTBY, A.L.; DELLA-FERA, M.A.; AZAIN, M.J.; PRINGLE, T.D.; BAILE, C.A. β -Adrenergic receptor agonists increase apoptosis of adipose tissue in mice. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.26, p.23-31, 2004.
- PENG, G.W.; CHIOU, W.L. Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. **J. Chromatogr. B.**, v.531, p.131-80, 1990.
- PORKWORLD, 2008. Disponível em: <http://www.porkworld.com.br>. Acesso em 13 de julho de 2008.
- 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. **Agric. Food Chem.**, v.55, p.4319 -4326, 2007.
- SCHINCKEL, A.P.; LI, N.; RICHERT, B.T.; PRECKEL, P.V.; EINSTEIN M.E. Development of a model to describe the compositional growth and dietary lysine requirements of pigs fed ractopamine. **J. Anim. Sci.**, v.81, p.1106-1119, 2003.
- SEE, M.T.; ARMSTRONG, T.A.; WELDON, W.C. Effect of a ractopamine feeding program on growth performance and carcass composition in finishing pigs. **J Anim Sci**, v.82, p.2474-2480, 2004.
- SHAN, J.; PAN, C.; ZHANG, J.; NIU, W. New Application of Mixed C18-SCX SPE Clean-Up in Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Determination of Six β 2-Agonist Residues in Pig's Liver. **J. Chrom.**, v. 20, p.43-57, 2008.
- SHAO, B.; JIA, X.; ZHANG, J.; MENG, J.; WU, Y.; DUAN, H.; TU, X. Multi-residual analysis of 16 β -agonists in pig liver, kidney and muscle by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chem.**, v.114, p.1115-1121, 2009.
-

- SHELVER, W.L.; SMITH, D.J. Application of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of ractopamine in incurred samples from food animals. **Agric. Food Chem.**, v.50, p.2742 -2747, 2002.
- SHELVER, W.L.; SMITH, D.J. Determination of ractopamine in cattle and sheep urine samples using an optical biosensor analysis: comparative study with HPLC and ELISA. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.3715 -3721, 2003.
- SHISHANI, E.; CHAI, S.C.; JAMOKHA, S.; AZNAR, G.; HOFFMAN, M.K. Determination of ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-fluorescence and liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v.483, p.137-145, 2003.
- SMITH, D.J. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of β -adrenergic agonists in livestock. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.173-194, 1998.
- SMITH, D.J.; FELL, V.J.; HUWE, J.K.; PAULSON, G.D. Metabolism and disposition of ractopamine hydrochloride by turkey poults. **Drug Metab. Dispos.**, v.21, p.624-633, 1993.
- STAHL, C.A.; CARLSON-SHANNON, M.S.; WIEGAND, B.R.; MEYER, D.L.; SCHMIDT, T.B.; E.P. BERG. The influence of creatine and a high glycemic carbohydrate on the growth performance and meat quality of market hogs fed ractopamine hydrochloride. **Meat Sci.**, v.75, p.143-149, 2007.
- STRYDOM, P. E., FRYLINCK, L., MONTGOMERY, J. L., SMITH, M. F. The comparison of three β -agonists for growth performance, carcass characteristics and meat quality of feedlot cattle. **Meat Sci.**, v.81, p.557-564, 2009.
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP), 32th Revision, The United States Pharmacopeial Convention: 2009.
- TORTUGA COMPANHIA ZOOTÉCNICA AGRÁRIA. Disponível em: www.tortuga.com.br. Acesso em: 2 de novembro de 2009.
- TURBERG, M.P.; RODEWALD, J.M.; COLEMAN, M.R. Determination of ractopamine in monkey plasma and swine serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection **J. Chromatogr. B**, v.675, p.279-285, 1996.
-

- UTTARO, B.E.; BALL, R.O.; DICK, P.; RAE, W.; VESSIE, G.; JEREMIAH, L.E. Effect of ractopamine and sex on growth, carcass characteristics, processing yield, and meat quality characteristics of crossbred swine. **J. Anim. Sci.**, v.71, p.2439-2449, 1993.
- WANG, L.; LI, Y.Q.; ZHOU, Y.K.; YANG, Y. Determination of four β -agonists in meat, liver and kidney by GC-MS with dual internal standards. **Chromatographia**, v.71, p.737-739, 2010a.
- WANG, W.; ZHANG, Y.; WANG, J.; SHI, X.; YE, J. Determination of β -agonists in pig feed, pig urine and pig liver using capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Meat Sci.**, v.85, p.302-305, 2010b.
- WATKINS, L.E.; JONES, D.J.; MOWREY, D.H.; ANDERSON, D.B.; VEENHUIZEN, E. L. The effect of various levels of ractopamine hydrochloride on the performance of finishing swine. **J. Anim. Sci.**, v.68, p.3588-3595, 1990.
- WILLIAMS, G.D. (1987) Comparative bioavailability of ^{14}C -ractopamine hydrochloride (031537, EL-737) following a single oral dose of 0.125mg/kg in the dog and monkey. Unpublished reports Nos D04686 and P03086 from Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Division of Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.
-