



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

LUCIANO MOLOGNONI

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA ANÁLISE
SIMULTÂNEA DE ÁCIDO SÓRBICO, NATAMICINA, NISINA E
TILOSINA EM PRODUTOS LÁCTEOS POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

**FLORIANÓPOLIS
2015**

LUCIANO MOLOGNONI

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA ANÁLISE
SIMULTÂNEA DE ÁCIDO SÓRBICO, NATAMICINA, NISINA E
TILOSINA EM PRODUTOS LÁCTEOS POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Ciência dos
Alimentos- UFSC/PGCAL como
requisito para obtenção do título de
mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Juliano De Dea
Lindner

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Molognoni, Luciano

Desenvolvimento de Metodologias para Análise Simultânea de Ácido Sórbito, Natamicina, Nisina e Tilosina em Produtos Lácteos por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas / Luciano Molognoni ; orientador, Juliano De Dea Lindner – Florianópolis, SC, 2015

147 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referência

1. Ciência dos Alimentos. 2. Análise de alimentos conformidade. 3. Conservantes antimicrobianos. 4. Produtos de origem animal. I. Lindner, Juliano De Dea. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

**Desenvolvimento de Metodologias para Análise Simultânea de
Ácido Sórbico, Natamicina, Nisina e Tilosina em Produtos Lácteos
por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas**

Por

Luciano Molognoni

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “**Mestredo** em Ciências dos Alimentos e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos”.

Florianópolis, 03 de agosto de 2015.

Prof^ª. Dr^ª. Roseane Fett
Coordenadora

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner
Orientador (UFSC)

Prof. Dr. Heitor Daguer
Membro (Mara)

Prof^ª. Dr^ª. Roseane Fett
Membro (UFSC)

Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant’Anna
Membro (UFSC)

AGRADECIMENTOS

A minha sólida família, pai Antônio L. Molognoni, mãe Giselda T. P. Molognoni, irmãs Juliana Molognoni e Fernanda Molognoni, mulher Joana D. Carniel e aos melhores amigos Juca, Sofia e Amy, por todos representarem a felicidade de um homem.

Aos bolsistas e funcionários do Serviço Laboratorial Avançado de Santa Catarina (SLAV), pelas muitas horas de convivência e aprendizado, em especial a Leandro Ploêncio, Angélica Lorenzetti e Andressa Valse por fazerem parte diretamente deste trabalho.

As Fiscais Dra. Cristhiane Cattani, responsável pelo Laboratório de Produtos de Origem Animal e a Adriana de Cássia Neves do Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal de Santa Catarina pelo apoio ao trabalho.

Ao chefe do SLAV e amigo Dr. Heitor Daguer por fornecer suporte aos funcionários, pesquisadores e bolsistas, constituindo-se de uma peça fundamental para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Juliano De Dea Lindner pela convivência e orientação do trabalho.

A Universidade Federal de Santa Catarina pela concretização da minha maturidade pessoal e profissional, ao CNPq (Projeto Sagres) e ao Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desta pesquisa.

Valeu Pessoal!

A confusão está, geralmente, associada com uma falta de compreensão, acompanhada de uma necessidade de entender. A única garantia real de libertação total da confusão é a despreocupação completa da compreensão.

Friederich Salomon Perls

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- (α)- erro alfa
- (β)- erro beta
- a- desvio padrão
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APCI- ionização química a pressão atmosférica (do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)
- APPI- fotoionização a pressão atmosférica (do inglês, *atmospheric pressure photospray ionization*).
- C18- coluna de fase estacionária octadecil
- CC $_{\alpha}$ - limite de decisão
- CC $_{\beta}$ - capacidade de detecção
- c $_i$ - coeficiente de sensibilidade
- CV- coeficiente de variação
- DAD- detecção de arranjos de diodo (do inglês, *diode array detector*)
- EC- Comissão Européia
- ES- padrão externo (do inglês, *external standard*)
- ESI- (do inglês, *electrospray ionization*)
- f - relação funcional
- FAO - *Food and Agriculture Organization*
- FDA- *Food and Drug Administration*
- HPLC-MS- cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (do inglês, *mass spectrometry by high-performance liquid chromatography*)
- IDA- ingestão diária aceitável
- INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade
- IS - padrão interno (do inglês, *internal standard*)
- ISO- (do inglês, *International Organization for Standardization*)
- IT - aprisionador de íons (do inglês, *ion trap*)
- IUPAC- (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*)
- JECFA- *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*
- K- fator de abrangência
- LANAGRO- Laboratório Nacional Agropecuário
- LMR- limite máximo de resíduo
- LOD- limite de detecção
- log P- coeficiente de partição
- LOQ- limite de quantificação
- LR- limite regulatório
- m/z- relação massa/carga

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEKC- cromatografia eletrocínica micelar (do inglês, *micellar electrokinetic chromatographic*)
MM- massa molar
MRM- monitoramento múltiplo de reações (do inglês, *multiple reaction monitoring*)
 v_{eff} - grau de liberdade efetivo
OIE- *World Organization for Animal Health*
PAMVet- Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal
PCRCL- Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Leite
PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
Q- quadrupolo
qHNMR- espectrometria de ressonância nuclear magnética quantitativa (do inglês, *Quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy*)
r- coeficiente de correlação da reta
RDC- Resolução da Diretoria Colegiada
RP- fase reversa (do inglês, *reversed-phase*)
SIF- Serviço de Inspeção Federal
SLAV-SC- Serviço Laboratorial Avançado de Santa Catarina
TOF - tempo de voo (do inglês, *time-of-flight*)
U- incerteza padrão expandida
u- incerteza padrão
u(y_i)- incerteza padrão de saída
u_c- incerteza padrão combinada
UPLC- cromatografia líquida de ultra-eficiência (do inglês, *ultra-performance liquid chromatography*)
UPLC-MS/MS- cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* (do inglês, *mass spectrometry in tandem by high-performance liquid chromatography*)
UV- detecção ultra-violeta (do inglês, *ultraviolet-visible detector*)
WHO- *World Health Organization*
x_i- incerteza padrão de entrada
y- mensurando

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Molécula da nisina.....	35
Figura 2. Molécula da natamicina.....	38
Figura 3. Molécula da tilosina.....	39
Figura 4. Molécula de ácido sórbico.....	41
Figura 5. Esquema geral de possibilidades de conformação para um espectrômetro de massa.....	49
Figura 6. Esquema interno de um espectrômetro de massa, do tipo triploquadropolo íon trap.....	51
Figura 7. Diagrama de causa e efeito com fases do processo de análise.....	57

CAPÍTULO 2

Figura 1. Representação gráfica dos três tipos de curvas de calibração utilizadas para a avaliação do efeito de matriz do doce de leite por análise de LC-ESI-MS/MS.....	92
Figura 2. Representação gráfica do ensaio de estabilidade dos extratos para a determinação de conservantes em doce de leite por LC-MS/MS.....	96

CAPÍTULO 3

Figure 1. Chromatogram of the three preservatives with retention times in minutes: natamycin (5.30), nisin (5.11) and sorbic acid (5.36) (A) and extract ion chromatograms: natamycin (666.2 Da), nisin (671.2 Da) and sorbic acid (112.9 Da) (B).....	120
Figure 2. Graphical plot of the calibration curves types used to evaluate matrix effects of different types of cheeses and cream in the determination of preservatives.....	126
Figure 3. Chromatograms of blank sample (A) and fortified blank sample with nisin, natamycin and sorbic acid (B).....	127
Figure 4. Graphical plot of the extracts stability test for the determination of preservatives in cheese and cream by tandem mass spectrometry-liquid chromatography.....	133
Figure 5. Graphical plot of the standard stability test for the natamycin, nisin and sorbic acid solutions by tandem mass spectrometry-liquid chromatography.....	135

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Parâmetros regulatórios da legislação brasileira para os antimicrobianos ácido sorbico, natamicina, nisina e tilosina em produtos lácteos.....	32
Tabela 2. Classificação das bacteriocinas.....	34
Tabela 3. Métodos e técnicas analíticas empregadas na determinação de antimicrobianos em produtos de origem animal.....	45
Tabela 4. Definições dos parâmetros convencionais de validação de acordo com a Decisão 657.....	53
Tabela 5. Tabela das principais distribuições de probabilidade e suas aplicações no cálculo da incerteza padrão de entrada (x_i).....	59

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Valores dos parâmetros após o monitoramento múltiplo de reações (MRM) utilizando fonte de eletrospray (ESI) em modo positivo para determinação de conservantes em doce de leite por LC-ESI-MS/MS.....	90
Tabela 2. Valores de recuperação, precisão intermediária e limites analíticos da determinação de conservantes em doce de leite por LC-ESI-MS/MS.....	94
Tabela 3. Quantificação dos conservantes em amostras comerciais de doce de leite por LC-MS/MS.....	98
Tabela 4. Valores das incertezas padrões da determinação de conservantes em doce de leite por LC-MS/MS usando padrão interno (IS) e padrão externo (ES).....	100

CAPÍTULO 3

Table 1. Optimized parameters for the determination of preservatives in the mass spectrometer using electrospray ionization in positive mode with schematic illustration of the Qtrap® hybrid triple quadrupole..	122
Table 2. Linearity and matrix effect for the determination of preservatives in cheeses and cream by tandem mass spectrometry-liquid chromatography method.....	124
Table 3. Recovery and precision for the determination of preservatives in cheeses and cream by tandem mass spectrometry-liquid chromatography method.....	129

Table 4. Youden robustness test experimental design.....	131
Table 5. Analytical limits for the determination of preservatives in cheeses and cream by tandem mass spectrometry-liquid chromatography method.....	132
Table 6. Quantification of preservatives in commercial cheeses and cream samples by tandem mass spectrometry-liquid chromatography.....	137
Table 7. Standard uncertainty values in the determination of preservatives in cheeses and cream by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.....	139

RESUMO

A deterioração dos alimentos de origem animal está relacionada com uma vasta gama de reações, destacando-se as de origem microbiológica. Dentre as substâncias antimicrobianas utilizadas para inibir microorganismos em produtos lácteos industrializados destacam-se: as bacteriocinas, os antibióticos macrolídeos polienos e os ácidos orgânicos. Com o intuito de garantir a segurança alimentar e a conformidade com a legislação, reprimindo fraudes, métodos de detecção rápida e simultânea para a determinação desses compostos estão em alta demanda. Neste trabalho, foram desenvolvidos métodos com simplificada extração, curto tempo de análise cromatográfica (cerca de dez minutos) e aplicados a diversas matrizes lácteas para determinação simultânea de natamicina, ácido sórbico, nisina e tilosina por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Todos os parâmetros de validação avaliados ficaram de acordo com os critérios estabelecidos pela Decisão 657/2002/EC. Os métodos foram utilizados para avaliar a conformidade de 135 amostras comerciais, o que demonstra versalidade e aplicabilidade. A ocorrência de não conformidades em 30% das amostras demonstra a importância de controlar o uso de conservantes em produtos lácteos. Muitas das amostras violadas não apresentavam o conservante declarado no rótulo. Métodos rápidos e com confiabilidade (validados) como os desenvolvidos neste trabalho, constituem de ferramentas importantes para a fiscalização de alimentos no Brasil, contribuindo para a segurança alimentar.

Palavras-chave: análise de alimentos conformidade; conservantes antimicrobianos; produtos de origem animal; validação.

ABSTRACT

The deterioration of foods of animal origin is due to several reactions, especially of microbiological origin. Among the antimicrobial substances used to inhibit microorganisms in processed dairy products are bacteriocins, macrolide polyene antibiotics and organic acids. In order to ensure food safety and compliance with the laws, fast and simultaneous detection methods for determining these compounds are in high demand. In this study, we developed methods with simplified extraction, short chromatographic analysis time (about ten minutes), which were applied to various dairy products for simultaneous determination of natamycin, sorbic acid, nisin and tylosin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (lc-ms/ms). All validation parameters evaluated were in accordance to the criteria established by commission decision 657/2002/ec. The methods were used to assess the compliance of 135 commercial samples, demonstrating its applicability and versatility. The occurrence of non-compliance in 30% of the samples demonstrates the importance of controlling the use of preservatives in dairy products. Many of the violated samples did not have the preservative informed on the label. Fast and reliable methods as the developed in this work proved to be a significant tool for surveillance of dairy products in brazil, contributing to improve food safety.

Keywords: food analysis; conformity; antimicrobial conservatives; foods of animal origin; validation.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
CAPÍTULO 1- REVISÃO DA LITERATURA	26
1 ANTIMICROBIANOS	29
1.1 Uso de antimicrobianos em produtos de origem animal	29
1.2 Bacteriocinas	33
1.2.1 Nisina	35
1.3 Anbióticos macrolídeos	36
1.3.1 Natamicina	37
1.3.2 Tilosina	38
1.3 Ácido sórbico	40
2 TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL	42
2.1 Espectrometria de massas.....	49
3 VALIDAÇÃO ANALÍTICA	52
3.1 Limite de decisão (CC_{α}) e capacidade de detecção (CC_{β}).....	54
4 INCERTEZA DE MEDIÇÃO EM PROCESSO ANALÍTICO ...	55
4.1 Etapas da estimativa da incerteza de medição.....	56
4.1.1 Modelagem do mensurando	56
4.1.2 Identificação e avaliação das incertezas-padrão de entrada ...	57
4.1.3 Determinação da incerteza padrão combinada e expandida ..	58
4.1.4 Relatando a incerteza de medição	63
CAPÍTULO 2- DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO SIMULTÂNEO PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO SÓRBICO, NATAMICINA E TILOSINA EM DOCE DE LEITE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS	77

CAPÍTULO 3- A CONTROL METHOD TO INSPECT THE USE OF PRESERVATIVES IN CHEESES AND CREAM BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY	109
CONSIDERAÇÕES FINAIS	147

INTRODUÇÃO

Agentes antimicrobianos são utilizados na industrialização de alimentos para evitar ou diminuir a multiplicação de micro-organismos indesejáveis. A multiplicação de micro-organismos deteriorantes pode gerar odores desagradáveis, deformação das embalagens, formação de películas, perda do sabor e de forma geral, diminuir a qualidade dos alimentos. Além de perdas econômicas para a indústria, perigos microbiológicos podem ocorrer quando micro-organismos patogênicos se multiplicam nos alimentos, como por exemplo, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum*, os quais podem gerar doenças veiculadas por alimentos (DVA) e consequentemente danos à saúde do consumidor.

Dentre as substâncias antimicrobianas utilizadas para inibir micro-organismos em produtos lácteos industrializados destacam-se: as bacteriocinas, os antibióticos macrolídeos polienos e os ácidos orgânicos. A utilização de uma dessas classes ou em conjunto, tem sido uma forte aliada do campo à indústria alimentícia. Isso ocorre por terem ação eficiente na conservação dos alimentos, não promoverem alterações sensoriais, poderem ser utilizadas em conjunto com culturas iniciadoras (*starter*) e por serem consideradas seguras, quando utilizadas de acordo com a legislação pertinente.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autoriza o uso do ácido sórbico, nisina e natamicina em diferentes tipos de queijos, requeijões e doce de leite. A bacteriocina nisina é utilizada em queijos com alta umidade para inibir a ação de bactérias Gram positivas e seus endoesporos. A natamicina é um antibiótico macrolídeo polieno utilizado na prevenção de fungos em superfícies de queijos curados e em doce de leite. O ácido sórbico é utilizado para prevenir o desenvolvimento de leveduras e mofos em diversos alimentos processados, tais como produtos derivados do leite.

O antibiótico macrolídeo tilosina foi proposto como medida preventiva de intoxicação alimentar estafilocócica em alimentos lácteos na década de 60. Atualmente, o uso da tilosina diretamente em alimentos não é permitido no mundo. Seu controle em alimentos é realizado pela análise de seus resíduos persistentes, já que existe a regulamentação para seu uso na produção animal como medicamento veterinário para prevenir doenças bacterianas e como promotor de crescimento.

Apesar desses antimicrobianos serem considerados aditivos seguros GRAS (do inglês, *Generally Recognized As Safe*) no controle de

micro-organismos em alimentos e na produção animal, algumas pesquisas sobre a toxicidade desses aditivos utilizando cobaias foram realizadas. Esses estudos alertaram sobre o cuidado ao utilizar abusivamente estes compostos na indústria de alimentos. Estes podem ser prejudiciais se a absorção pelo ser humano for maior do que dos limites regulatórios preconizados. O uso dessas substâncias podem estar relacionadas a alterações na resposta imune, efeitos genotóxicos, intolerância idiossincrática, urticárias e pseudo-alergias em pessoas sensibilizadas a esses compostos.

Com o intuito de garantir a segurança alimentar, dos alimentos e a conformidade com as legislações, reprimindo fraudes nos alimentos, métodos de detecção rápida e simultânea para a determinação desses tipos de compostos estão em alta demanda. Diversos métodos empregando distintas técnicas têm sido desenvolvidos para a identificação e quantificação de antimicrobianos em alimentos, tais como: a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjos de diodo (HPLC-DAD, do inglês, *high performance liquid chromatography- diode array detector*), de fase reversa (RP, do inglês, *a reversed-phase*), detecção UV (do inglês, *Ultraviolet-visible*), a cromatografia eletrocinética micelar (MECK, do inglês, *micellar electrokinetic chromatographic*), entre outras. Entretanto, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* (LC-MS/MS, do inglês, *mass spectrometry in tandem by liquid chromatography*) é considerada uma técnica seletiva, sensível e moderna para a determinação desses compostos, além de possuir a capacidade de detecções simultâneas com confiabilidade.

As substâncias antimicrobianas podem ser utilizadas indevidamente na produção de alimentos, seja por desrespeito ao limite máximo residual, por aplicação indevida com intenção de mascarar uma baixa qualidade de matéria prima, ou ainda, para mascarar as deficiências nas boas práticas de fabricação. Na produção animal, o monitoramento de resíduos de antimicrobianos como tilosina no leite e seus derivados também é requerido, a fim de garantir a segurança da população. O desenvolvimento de metodologias modernas, rápidas e confiáveis para a avaliação da conformidade do uso desses antimicrobianos em diversas matrizes lácteas, permite que a fiscalização, para antimicrobianos como natamicina e nisina no Brasil, seja mais eficiente e atuante, e que o consumidor possa desfrutar de produtos mais seguros do ponto de vista dessas substâncias.

Motivado pela importância e pela carência de dados analíticos relacionados à quantificação desses conservantes em produtos lácteos

industrializados no Brasil, este estudo teve como objetivo desenvolver e validar métodos analíticos para a determinação simultânea de ácido sórbico, natamicina, nisina, e tilosina em produtos lácteos por LC-MS/MS, tornando-os ferramentas de fiscalização.

CAPÍTULO 1
REVISÃO DA LITERATURA

1 ANTIMICROBIANOS

1.1 Uso de antimicrobianos em produtos de origem animal

A deterioração dos alimentos de origem animal deve-se a uma vasta gama de reações, destacando-se as de origem microbiológica. O processo industrial de maturação promove alterações sensoriais a partir de reações bioquímicas e bacteriológicas como proteólise, lipólise e fermentação, resultando em melhorias do sabor, palatabilidade e conservação do produto (OLIVEIRA, 1986). Embora não substitua a aplicação das boas práticas de fabricação, a maturação é frequentemente uma forma de prevenir a ascensão de micro-organismos patogênicos e deterioradores sem a utilização abusiva de conservantes químicos (SCHULZ, BONELLI, BATISTA, 2009). Infelizmente, somente um processo de fabricação natural como a maturação, não é eficaz na conservação e longevidade dos produtos comerciais industrializados.

Os fungos são micro-organismos filamentosos conhecidos por seu potencial em alterar o sabor e qualidade de alimentos (MAZIERO, BERSOT, 2010). A ação deteriorante de leveduras pode gerar deformação de embalagens pela produção de elevada quantidade de gás, formação de películas, ligeiro odor de fermentação e perda do sabor (LOUREIRO, QUEROL, 1999).

Dentre os micro-organismos patogênicos contaminantes presentes em produtos de origem animal destacam-se a *Listeria monocytogenes*, o *Staphylococcus aureus* e o *Clostridium botulinum*, os quais podem gerar danos à saúde do consumidor, como por exemplo, aborto, intoxicação e botulismo, respectivamente. Apesar de o Brasil apresentar deficiências no controle epidemiológico em relação a doenças veiculadas por alimentos de origem animal, frequentemente relatos de toxinfecções são apresentados pela comunidade científica internacional (SABIONI, HIROOKA, SOUZA, 1988; SILVA, BERGAMINI, DE OLIVEIRA, 2010). Os Produtos lácteos são potenciais veiculadores de patógenos e a utilização de antimicrobianos é uma estratégia de prevenção sobre micro-organismos patogênicos e deteriorantes, sem causar alteração sensorial significativa no produto (OLIVEIRA, SIQUEIRA, SILVA, 2012). Dentre os antimicrobianos utilizados em produtos lácteos destacam-se: as bacteriocinas, os antibióticos macrolídeos políenicos e os ácidos orgânicos (ROSS, MORGAN, HILL, 2002; RAJCHL et al., 2010; MORAES et al., 2007; BRUSTOLIN, 2009; KALLINTERI, KOSTOULA, SAVVAIDIS, 2013).

O regulamento técnico de identidade e qualidade de produtos lácteos autoriza o uso da bacteriocina nisina e do antibiótico macrolídeo polieno natamicina, em queijos, requeijões e doce de leite, sendo permitido neste último produto apenas a natamicina (BRASIL, 1996).

Estudos demonstraram que a utilização da cultura de *Lactococcus lactis* produtora de nisina é uma forma eficaz na prevenção do estufamento tardio causados pelo *Clostridium beijerinckii* em queijos (GARDE et al., 2011). Já a natamicina atua contra bolores e leveduras, melhorando a aparência, o tempo de vida comercial e reduzindo os riscos de formação de micotoxinas nos alimentos (BRUSTOLIN, 2009). Em pesquisa realizada por Kallinteri, Kostoula, Savvaidis et al. (2013), os autores determinaram que o uso da natamicina isolada ou combinada com a nisina foi eficiente na inibição da multiplicação de fungos (leveduras e bolores), mantendo as características do produto durante o tempo de vida comercial. Estudos reportando a utilização de natamicina em filmes biológicos para revestimento de queijos também foram relatados, aumentando consideravelmente o tempo de prateleira dos produtos lácteos estudados (RESA, GERSCHENSON, JAGUS, 2014; RESA, JAGUS, GERSCHENSON, 2014).

Apesar da legislação brasileira permitir a utilização desses conservantes na fabricação de queijos, existem restrições e limites a serem respeitados, sendo que a natamicina poderá ser aplicada apenas na superfície de queijos cortados e fatiados, não podendo ser detectada a 2 mm de profundidade (ausente na massa). Já a nisina tem como limite regulatório (LR) máximo de concentração $12,5 \text{ mg kg}^{-1}$ (BRASIL, 1996). Da mesma forma, a nisina e a natamicina podem estar presentes em requeijões em até $12,5 \text{ mg kg}^{-1}$ e 1 mg dm^{-2} na superfície, respectivamente. Em doce de leite a adição de conservantes inclui apenas a natamicina, sendo aplicada na superfície e com um LR de 1 mg dm^{-2} (BRASIL, 1996).

Nos anos 60, o antibiótico macrolídeo tilosina foi estudado em alimentos. A utilização direta nos alimentos foi investigada a fim de evitar a multiplicação de *Staphylococcus* sp. e *Clostridium botulinum* (Greenberg & Silliker, 1962; Denny, Sharpe & Bohrer, 1961). Atualmente, a utilização da tilosina em alimentos não é permitido em todo o mundo. Estudos têm demonstrado que o consumo regular de alimentos contendo tilosina pode causar efeitos indesejáveis, tais como manifestações alérgicas, citotóxica, efeitos mutagênicos e carcinogênicos nefrotóxicos, distúrbios reprodutivos e o desenvolvimento de microrganismos resistentes a antibióticos utilizados em terapia humana (Nisha, 2008; FAO, 2015). Agências como USDA

(United States Department of Agriculture) e EMA (Agência Europeia de Medicamentos) determinam o limite máximo de resíduos (LMR) de 50 mg L⁻¹ no leite (USDA, 2015; EMA, 2002). O Codex Alimentarius e o MAPA determinam um LMR de 100 mg L⁻¹ (Codex Alimentarius Commission, 2009).

A utilização de ácidos orgânicos para conservação de alimentos também merece destaque, visto que, possuem maior solubilidade em relação aos antimicrobianos biológicos natamicina e nisina, baixo efeito no sabor dos alimentos e dispõem da liberação para adição em muitos tipos de alimentos processados, características essas, ideais para um conservante (BAIRD-PARKER, 1980).

O ácido sórbico e seus sais de Ca e K tem apresentado efeitos inibitórios sobre leveduras, fungos filamentosos e uma vasta gama de bactérias (LIICK, 1976; SOFOS, 1995; RAJCHL et al., 2010; MORAES et al., 2007). A principal ação inibitória dos sorbatos é contra leveduras e bolores, onde pequenas concentrações já causam efeito antifúngico. Em leveduras, é necessária uma maior quantidade do conservante para que seja eficiente. Estudos reportaram que a dose mínima letal para *Saccharomyces cerevisiae* foi de 1600 mg kg⁻¹ (KUBO & LEE, 1998) e que sua ação foi eficaz na redução de fungos filamentosos e leveduras em experimentos realizados com produtos lácteos (MORAES et al., 2007). Apesar dos sorbatos serem mais efetivos na inibição de fungos e leveduras, eles também são capazes de inibir algumas bactérias, tais como: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Vibrio parahaemolyticus* e bactérias psicrotróficas deteriorantes, como as *Pseudomonas* sp.

A legislação brasileira permite a utilização do ácido sórbico em queijos, requeijão e doce de leite com um LR de acordo com as características de cada matriz (BRASIL, 1996). Na Tabela 1 são apresentados os LR contidos na legislação brasileira para os antimicrobianos ácido sórbico, natamicina, nisina e tilosina em produtos lácteos.

Tabela 1. Parâmetros regulatórios da legislação brasileira para os antimicrobianos ácido sorbico, natamicina e nisina em produtos lácteos.

Produto lácteo	Antimicrobiano	Parâmetro Máximo	Referência
Queijos cortados e fatiados	Ácido sorbico	1000 mg kg ⁻¹ 5 mg kg ⁻¹ (não detectável a 2 mm de profundidade)	Brasil (1996)
	Natamicina		
	Nisina	12,5 mg kg ⁻¹	
Queijos frescos e ricota	Ácido sorbico	1000 mg kg ⁻¹	Brasil (1996)
	Natamicina	Uso não permitido	
	Nisina	12,5 mg kg ⁻¹	
Doce de leite	Ácido sorbico	600 mg kg ⁻¹ 1 mg dm ⁻² (em superfície livre)	Brasil (1996)
	Natamicina		
	Nisina	Não estabelecido	
Creme de Leite	Ácido sorbico		Brasil (1996)
	Natamicina	Uso não permitido	
	Nisina		
Requeijão	Ácido sorbico	1000 mg kg ⁻¹ 1 mg dm ⁻² (em superfície livre)	Brasil (1996)
	Natamicina		
	Nisina	12,5 mg kg ⁻¹	
Leite	Ácido sorbico		Brasil (1996)
	Natamicina	Uso não permitido	
	Nisina		

Fonte: o próprio autor

Embora esses conservantes sejam legalmente utilizados em alimentos, eles podem ser prejudiciais se a ingestão pelo ser humano for maior do que nos LR preconizados. A nisina e a natamicina foram consideradas seguras para o consumo humano com ingestão diária aceitável (IDA) de 2,9 mg kg⁻¹ (FDA, 1988) e 0,3 mg kg⁻¹ por peso

corpóreo, respectivamente (JECFA, 2002). Já a IDA para tilosina é de 0,03 mg kg⁻¹ de peso corpóreo (JECFA, 2008) e para o ácido sórbico e seus derivados, foi estipulado um IDA de 25 mg kg⁻¹ por peso corpóreo (JECFA, 2002).

Paseiro-Cerrato et al. (2013) analisaram 26 produtos alimentícios oriundos da Espanha e Argentina, os quais incluíam diversos tipos de queijos, e detectaram amostras com níveis de natamicina acima do permitido e indevidamente adicionadas nas zonas não permitidas das amostras. Em estudo realizado por Fuselli et al., (2010), a irregularidade do uso da nisina foi observada quando detectados níveis acima do permitido em queijos. Já o ácido sorbico foi determinado em diferentes tipos de alimentos processados disponíveis no mercado brasileiro, apenas produtos lácteos não estavam de acordo com a legislação quanto ao LR do antimicrobiano (TFOUNI, TOLEDO, 2002).

Foi realizado um estudo por Gradinaru, Popescu & Solcan, onde realizaram o monitoramento da tilosina no leite durante três anos seguidos. Constatou-se que os valores de tilosina estavam acima do LMR estabelecido pela União Européia em uma fração significativa do estudo, concluindo-se que a contaminação do leite por resíduos de tilosina acima dos valores considerados seguros pode constituir um risco potencial à saúde do consumidor (GRADINARU, POPESCU, SOLCAN, 2011). Em revisão realizada por Ferreira et al., (2012), revelou-se que de trinta e três publicações sobre o monitoramento de resíduos de antimicrobianos, 9,1% citavam tilosina, constatando-se uma pequena margem de estudo diante da sua importância (FERREIRA et al., 2012).

Considerando o amplo emprego da tilosina na cadeia produtiva do leite, aliado à inclusão recente no escopo analítico dos programas de resíduos de medicamentos veterinários no Brasil, do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC) do MAPA e da ANVISA, o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet), a necessidade de um estudo mais detalhado sobre essa classe se faz necessário, assim como a conformidade dos produtos derivados de leite (BRASIL, 2003; BRASIL, 2015).

1.2 Bacteriocinas

As bacteriocinas são peptídeos de baixa massa molecular (3 a 10 kDa) ou proteínas biologicamente ativas que apresentam ação bactericida e/ou bacteriostática. Possuem ponto isoelétrico elevado,

apresentam regiões hidrofóbicas e hidrofílicas em sua estrutura. A maioria desses peptídeos são termoestáveis e mantêm suas atividades antimicrobianas a temperaturas normalmente utilizadas nas indústrias de alimentos (JOERGER, KLAENHAMMER, 1990). Segundo Kaiser e Montvill (1993), para uma substância ser chamada de bacteriocina, basta apenas ser de origem proteica e não ter ação inibitória sobre o próprio micro-organismo que a produziu.

Segundo Drider et al. (2006), as bacteriocinas são divididas por classes e subclasses de acordo com suas características genéticas e bioquímicas (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação das bacteriocinas.

Classificação	Característica	Subcategoria	Exemplos
Classe I ou Lantibióticos	Lantionina ou peptídeos contendo β -lantionina	Tipo A (moléculas lineares)	Nisina A, Nisina Z,
		Tipo B (moléculas globulares)	Subtilina, Mersacidina
Classe II	Classe heterogênea de pequenos peptídeos termoestáveis		Pediocina, Enterocina
		Subclasse IIa- (bacteriocinas tipo antilisterial-pediocina)	Plantaricina, Lactacina-F
		Subclasse IIb (composto de dois peptídeos)	Lactococcina
		Subclasse IIc- (outras bacteriocinas)	
Classe III	Grandes peptídeos termolábeis		Helveticina J, Millericina B

Fonte: (DRIDER et al., 2006)

As bacteriocinas diferem dos antibióticos em alguns aspectos. As bacteriocinas são definidas como metabólitos primários sintetizados via ribossomal, com mecanismos de ação nas membranas

citoplasmáticas dos micro-organismos. Já os antibióticos são metabólitos secundários (*extrolites*) que apresentam diversos mecanismos de ação sobre os micro-organismos, tais como: inibição da síntese proteica, inibição da síntese de ácidos nucleicos, replicação cromossômica, alteração de permeabilidade de membrana.

A pediocina é uma bacteriocina pertencente à classe II, subclasse IIa. Com aplicação antilisterial, a pediocina possui grande potencial como conservante de grau alimentar para produtos de origem animal (ALBANO et al., 2009; GARSA et al., 2014). Com características importantes e fundamentais de uma bacteriocina, já está sendo muito estudada em processos industriais e surge como uma promessa futura para atuar como antimicrobiano (GARSA et al., 2014).

1.2.1 Nisina

A nisina é uma bacteriocina classe I (Lantibiótico) produzida pela bactéria ácido láctica *Lactococcus lactis*, descoberta inicialmente por Rogers e Whittier (1928). É um polipeptídeo catiônico composto de 34 resíduos de aminoácidos, com aminoácidos terminais isoleucina (NH₂) e lisina (COOH). Ocorrem dois tipos naturais de nisina: nisina A (Figura 1) e nisina Z, que diferem em um aminoácido na posição 27. A asparagina na nisina Z é substituída por histidina na nisina A. Isso ocorre devido uma simples troca de par de bases para o códon correspondente (MULDERS et al., 1991).

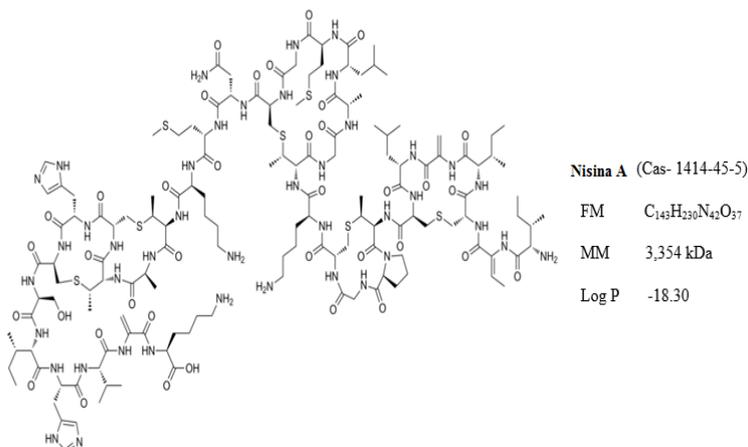


Figura 1. Molécula da nisina A.

Fonte: <http://www.chemicalize.org/structure/#!/mol=nisin&source=fp>

Suas atividades biológicas são altamente dependentes do pH, temperatura e natureza do substrato. A nisina apresenta solubilidade em água e estabilidade em meio ácido, sendo insolúvel em condições alcalinas. Possui um ponto isoelétrico muito elevado de 10,12. Este polipeptídeo apresenta estabilidade térmica, podendo ser submetido a tratamentos térmicos a 120°C por 15 min em condições de pH 2, sem que ocorra sua desnaturação (DELVES-BROUGHTON, 2005).

É utilizado como conservante de grau alimentar para inibir ação de bactérias Gram positivas e seus esporos, não sendo eficaz contra micro-organismos Gram negativos, bolores, leveduras e vírus contidos em alimentos (SCHULZ, BONELLI, BATISTA, 2009). Dependendo de sua concentração, pode ser bactericida ou bacteriostático. Apesar das diferenças, os mecanismos de ação envolvem danos na membrana plasmática dos micro-organismos alvos, resultando em alteração na permeabilidade e biossíntese da parede celular (COTTER, HILL, ROSS, 2005). Esses danos se devem basicamente pela atração eletrostática entre as cargas positivas do peptídeo e cargas negativas da superfície das membranas das bactérias, caráter anfipático do peptídeo e translocação do peptídeo através da membrana dos micro-organismos, ocasionando a morte celular (JENSSEN, HAMILL, HANCOCK, 2006).

Os principais estudos toxicológicos envolvendo bacteriocinas se referem aos testes realizados para a aprovação do uso da nisina como bioconservador em alimentos (FDA, 1988). Entretanto, posteriormente alguns estudos de toxicidade sobre esses aditivos utilizando administração oral em cobaias foram relatados. O uso de bacteriocinas pode estar relacionado a alterações na resposta imune e a efeitos genotóxicos. A nisina foi capaz de modular a resposta imune de roedores, aumentando a quantidade de linfócitos T (CD4 e CD8) e também aumentando a quantidade de macrófagos e monócitos na circulação periférica (PABLO et al., 1999).

1.3 Anbióticos macrolídeos

Os macrolídeos são antibióticos que apresentam um anel macrolídeo de lactona, ao qual se ligam açúcares. Estes antibióticos são classificados de acordo com o número de átomos do seu anel macrocíclico. Essas substâncias constituem a segunda classe de antimicrobianos mais utilizados em animais produtores de alimentos, sendo a tilosina e a espiramicina presente em um maior número de formulações disponíveis para bovinos e aves. São capazes de atingir altas concentrações no interior das células com uma boa distribuição nos

tecidos, além de possuírem um tempo de meia-vida longa (burkin, galvidis, 2012).

Os polienos são estruturas planas de anéis macrolídeos. Estruturalmente, os macrolídeos poliênicos são caracterizados pelo macrociclo hidrolisado contendo um açúcar, no caso da natamicina, esse açúcar constitui-se de uma piranose. Mas sua característica distinta é a presença de um cromóforo formado por um sistema conjugado de 3 a 7 duplas ligações no anel macrolactona (MENDES et al., 2001).

Em uma reunião conjunta entre as entidades internacionais FAO (*Food and Agriculture Organization*), WHO (*World Health Organization*) e OIE (*World Organization for Animal Health*) reportaram que o uso de macrolídeos em quantidades acima do recomendado, podem criar condições favoráveis ao surgimento, persistência e difusão de micro-organismos antibiótico-resistentes (FAO, 2015). Já a Comunidade Europeia proibiu o uso da tilosina como promotor de crescimento após reconhecer que o vasto uso dessa substância na alimentação animal contribui, a longo prazo, para a seleção de micro-organismos resistentes e sua provável transferência para o homem ou dos seus genes de resistência para outros patógenos (UE, 1998).

1.3.1 Natamicina

A natamicina, também conhecida como pimaricina, é um antibiótico antifúngico de largo espectro (fungistático e fugicida) do grupo macrolídeo polieno, produzido por fermentação aeróbia de *Streptomyces natalensis* e espécies relacionadas (APARICIO et al., 2000). Foi descoberta inicialmente por Ceder em 1964, e consiste em um grande anel de lactona de vinte e cinco átomos de carbono e um anel de açúcar piranose, unidos por ligação glicosídica na posição C₁₅ (Figura 2). Em forma de pó, não apresenta gosto e odor, sendo estável à degradação pela luz e temperatura. Possui estabilidade na faixa de pH 4,5- 9,0. A natamicina é insolúvel em água e em óleos minerais, apresentando solubilidade em metanol (CEDER, 1964).

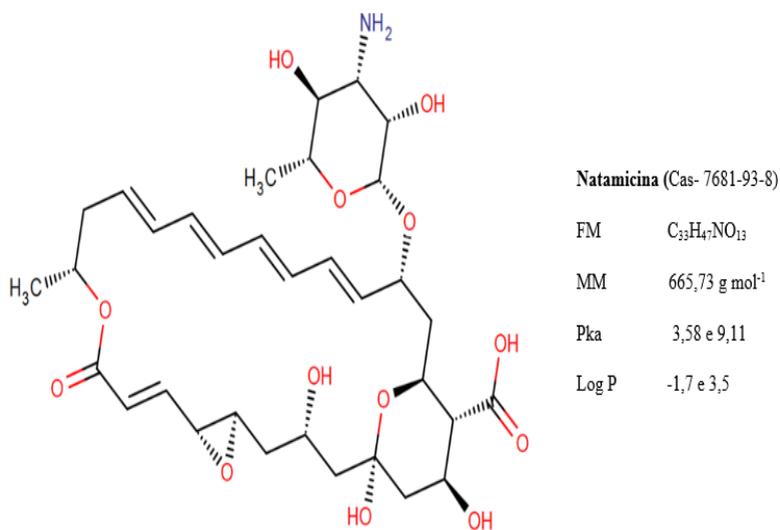


Figura 2. Molécula da natamicina.

Fonte: <http://www.chemicalize.org/structure/#!/mol=natamycin&source=fp>

A ação da natamicina se dá ao fato de se ligar irreversivelmente à membrana celular dos fungos, devido à sua elevada afinidade com o ergosterol, perturbando as funções das proteínas dependentes do esterol. As bactérias são insensíveis aos agentes poliênicos, já que a membrana celular não apresenta esteróis em suas estruturas (TE WELCHER et al., 2008).

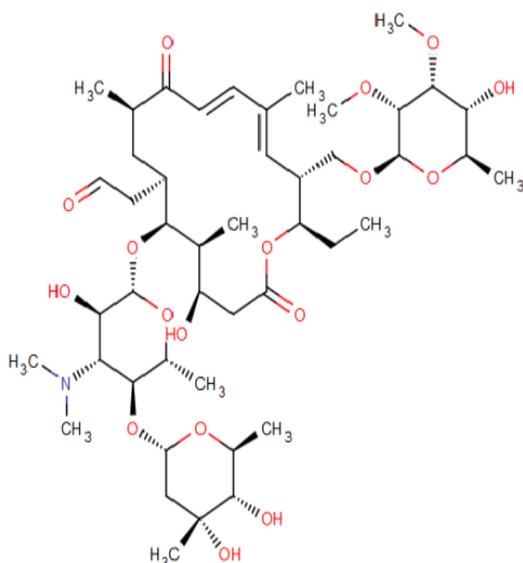
A natamicina é reconhecida como GRAS e com aprovação em 40 países para combater fungos e bolores em produção de queijos curados e embutidos cárneos fermentados (BRUSTOLIN, 2009; KALLINTERI, KOSTOULA, SAVVAIDIS, 2013). Entretanto, foram relatados estudos sobre efeitos genotóxicos da natamicina em roedores após a administração de doses acima das recomendadas para alimentos (MARTÍNEZ et al., 2013).

1.3.2 Tilosina

A tilosina é um antibiótico macrolídeo, produzido por *Streptomyces fradiae*. Foi descoberta por McGuire e colaboradores em 1959, isolado a partir de culturas de solo originalmente obtidos da Tailândia (MCGUIRE et al., 1961). Consiste predominantemente de

tilosina A (fator A) e quantidades variadas de tilosina fator B (desmicosina), tilosina fator C (macrosina) e tilosina fator D (relomicina), dependendo da fonte de produção. A tilosina A degrada-se gradualmente em tilosina B em condições ácidas e, apesar de ser considerado o resíduo marcador, a presença dos outros tipos de tilosina pode levar a uma diferença de 15% na quantificação de seus resíduos totais (SISMOTTO, PASCHOAL, REYES, 2013).

A tilosina (Figura 3) é considerada uma base fraca. Em sua forma cristalina, possui solubilidade em solventes orgânicos e a capacidade de formar sais solúveis em água com estabilidade na temperatura ambiente e faixa de pH 4-9 (TROLLDENIER, ARENILLAS, 1980).



Tilosina (Cas- 1401-69-0)

FM $C_{46}H_{77}NO_{17}$

MM 916.10 g mol⁻¹

Pka 7,2 e 12,44

Log P 1,46 e 2,32

Figura 3. Molécula da tilosina

Fonte: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=tylosin&source=fp>

Possui ação contra bactérias Gram-positivas, micoplasmas e certas bactérias Gram-negativas. Sua ação é principalmente bacteriostática. A tilosina, na forma de tartarato de tilosina ou fosfato de tilosina é utilizada no controle de doenças e na promoção do crescimento de animais produtores de alimento. Ela aumenta na

eficiência alimentar e reduz a incidência de abscessos no fígado. Já no controle de doenças, previne a pneumonia associada ao micoplasma, tratamento da pneumonia, podridão dos cascos, difteria, metrite e mastite aguda em animais adultos e à *Pasteurella multocida* em bezerros, podendo ser administrada diretamente na ração ou via venal (FAO/WHO, 2009).

O modo de ação da tilosina está no fato de ela inibir a síntese de proteínas do micro-organismo através da ligação à subunidade 50S do ribossomo. Macrolídeos em geral, não se ligam a ribossomos de mamíferos, o que os promove a um grupo potencialmente seguro para uso como antimicrobiano (RIVIERE, PAPICH, 2013).

Os primeiros estudos sobre a toxicidade da tilosina em mamíferos foram realizados por Anderson et al. (1966). Com base nos dados apresentados, o nível da substância sem efeitos adversos foi de 10.000 mg kg⁻¹ e 4000 mg kg⁻¹ de tilosina para ratos e cães, respectivamente. Este estudo demonstrou a segurança da tilosina como aditivo alimentar direto. Entretanto, estudos subjacentes demonstram que a ingestão prolongada de alimentos contendo tilosina podem acarretar efeitos diretos indesejáveis como: manifestação alérgica em indivíduos hipersensíveis, efeitos citotóxicos, carcinogênicos, mutagênicos, nefrotóxicos, toxicidade para a medula óssea e desordem reprodutiva. Alguns efeitos indiretos também foram constatados nos estudados como, por exemplo, o desenvolvimento de micro-organismos resistentes a antimicrobianos usados na terapia humana (NISHA, 2008; FAO, 2015).

1.3 Ácido sórbico

O ácido sórbico foi isolado primeiramente por A.W. Hofmann (1859) (Figura 4), a partir da destilação do óleo do fruto *Sorbus aucuparia* (HOFMANN, 1959). Esse ácido é encontrado na forma de cristais ou pó branco, de odor característico, possui pouca solubilidade em água, mas é bastante solúvel em alcoóis. Os sorbatos são os sais do ácido sórbico, como o sorbato de potássio e de cálcio. O sorbato de potássio tem uma coloração branca e apresenta um formato de esferas obtidas por extrusão. Possui uma maior ação na forma não dissociada, portanto sendo mais eficaz em alimentos com pH abaixo de 6,5 (STOPFORTH, SOFOS, BUSTA, 2005).

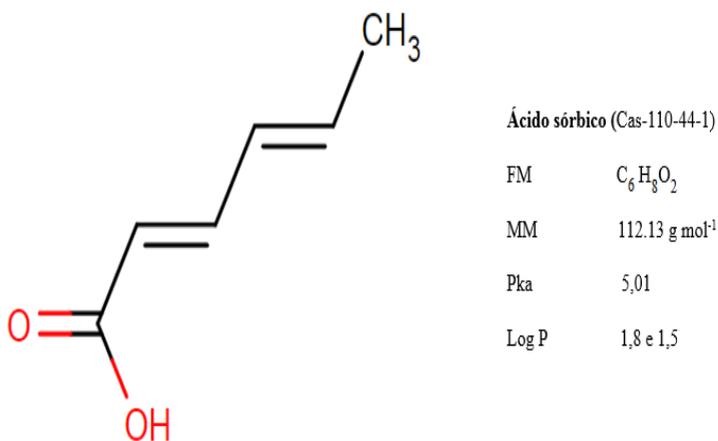


Figura 4. Molécula de ácido sórbico.

Fonte: <http://www.chemicalize.org/structure/#!/mol=sorbic&source=fp>

Os sorbatos podem ser utilizados para prevenir a formação de leveduras e mofos em alimentos processados, tais como produtos curados derivados do leite, sem intervir na ação das culturas iniciadoras (MORAES et al., 2007).

O mecanismo de ação do ácido sórbico sobre as bactérias ainda não está totalmente elucidado, porém podem causar modificações na morfologia de células microbianas, alterações nas funções da membrana celular inibindo funções de transporte e da atividade metabólica (SOFOS, 1986). Já estudos relacionados ao mecanismo de defesa em fungos filamentosos, relatam a redução da assimilação de carbono, e substratos de glicose, acetato, succinato, lactato e enzimas vitais, tais com: malato, isocitrato, α -cetoglutarato, desidrogenase, fumarase e aspartase, entre outras. A inibição da desidrogenases, interferindo na assimilação oxidativa também foi observada (SOFOS, 1986; LIICK, 1976; MORAES et al., 2007;).

O sorbato de potássio é legalmente utilizado em alimentos, mas seu controle é requerido para a conformidade de acordo com a legislação pertinente evitando danos para a saúde do consumidor (KUPROVSKYTE, PRANAITYTE, & KUDARAUSKAS, 2002; MAZDEH et al., 2014). A legislação brasileira permite a utilização do ácido sórbico em queijos com um limite máximo de 1000 mg kg^{-1} e 600 mg kg^{-1} em doce de leite (BRASIL, 1996).

Investigações toxicológicas extensivas foram realizadas com o ácido sórbico e seus sais, incluindo os testes de toxicidade aguda e crônica, estudos sobre carcinogenicidade (GAUNT, 1975; HENDY et al, 1976), teratogenicidade e mutagenicidade também foram relatados (FDA, 1975). Apesar dos sorbatos apresentarem baixa toxicidade nos estudos, foram reportados casos de intolerância idiossincrática, urticárias e pseudo alergias em pessoas sensibilizadas a esse composto (DEUEL et al., 1954; HANNUKSELA, HAAHTELA, 1987; JUHLIN, 1981; WALKER, 1990).

2 TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

Com o intuito de garantir a segurança alimentar e proteger os consumidores, o uso de conservantes em alimentos é estritamente regulado por autoridades nacionais e internacionais (FUSELLI et al., 2012). O controle na adição de antimicrobianos tais como ácido sorbico, natamicina, nisina e resíduos tilosina em produtos de origem animal são requeridos a fim de garantir a conformidade aos parâmetros regulamentados.

Devido às exigências pelo desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de antimicrobianos regulamentados em alimentos lácteos, já existe a aprovação de métodos normalizados pela ISO (do inglês, *International Organization for Standardization*). A determinação de natamicina em superfície de queijos curados pela técnica de (HPLC-UV) (ISO 9233:2008), determinação de nisina em queijos por LC-MS (ISO/TS 27106:2009) e a determinação de ácido sórbico em leite e derivados pela técnica HPLC- RP (ISO 9231:2008).

Diversos métodos têm sido desenvolvidos utilizando diferentes técnicas analíticas para a identificação e quantificação desses tipos de conservantes em alimentos de origem animal, como a cromatografia eletrocínica micelar MEKC (SOLIMAN, DONKOR, 2010), a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjos de diodo (HPLC-DAD) (PASEIRO-CERRATO et al., 2013; ESFANDIARI et al., 2013), a cromatografia líquida de fase reversa (HPLC- RP) com detecção de UV (GUARINO et al., 2011), a espectrometria de ressonância nuclear magnética quantitativa (qHNMR, do inglês *Quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy*) (OHTSUKI et al., 2012), entre outras.

No entanto, métodos mais seletivos e de análise simultânea desses aditivos, aplicados em matrizes lácteas são escassos (ESFANDIARI et al., 2013). A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS, do inglês *mass spectrometry by high-performance liquid chromatography*) é considerada uma técnica seletiva e sensível para a determinação de antimicrobianos em matrizes lácteas (SCHNEIDER, BECKER, PISCHETSRIEDER, 2010; SCHNEIDER, WERKMEISTER, PISCHETSRIEDER, 2011; SCHNEIDER et al., 2011; FUSELLI et al., 2012; TOLIN et al., 2012; KO, KYUNG YUK et al., 2015; GÖREN et al., 2015). A análise simultânea de antimicrobianos frequentemente utilizados em queijos (ácido sórbico, natamicina e nisina) por meio de sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* (LC-MS/MS) mostrou-se um método rápido, seletivo e confiável, com recuperações acima de 80%. Entretanto, ressalta-se que apresentou um efeito de matriz considerável, sendo um fator importante a considerar em processos de validação analítica (FUSELLI et al., 2012; GÖREN et al., 2015).

A cromatografia em fase líquida de ultra-eficiência (UPLC, do inglês *ultra-performance liquid chromatography*) consiste em uma evolução tecnológica do (HPLC do inglês *high-performance liquid chromatography*). Desenvolvida e adequada para as necessidades do emprego de partículas sub-2- μm em altas pressões, possui uma maior resolução cromatográfica e confere uma redução do tempo de retenção dos analitos. (JERKOVICH, LOBRUTTO, VIVILECCHIA, 2005; RAINVILLE, PLUMB, 2007; WREN, 2005; WREN, TCHELITCHEFF, 2006). O acoplamento da cromatografia líquida de ultra eficiência à espectrometria de massas em modo *tandem* (UPLC-MS/MS, do inglês *mass spectrometry in tandem by high-performance liquid chromatography*), apresenta algumas vantagens em relação ao acoplamento com um HPLC, como: varreduras mais rápidas, maior sensibilidade em monitoramento múltiplo de reações (MRM, do inglês *multiple reaction monitoring*), melhor adequação as fontes de íons por APCI (do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), análises mais rápidas e melhor resolução, utilizando ciclos mais altos em resposta aos altos fluxos empregados.

A aplicabilidade da UPLC acoplada à espectrometria de massas em modo MS/MS (do inglês, *mass spectrometry in tandem*) foi constatada quando utilizada para o monitoramento simultâneo de 150 analitos em leite, incluindo os antibióticos macrolídeos tilosina e natamicina. Esse método permitiu a triagem para mais de 50 amostras

por dia, permitindo a determinação da maioria dos compostos com baixos limites de detecção, apesar da supressão de sinal obtido devida a complexidade da matriz (ORTELLI et al., 2009).

Na Tabela 3 são apresentados alguns métodos com suas respectivas técnicas analíticas empregadas na determinação de antimicrobianos em alimentos.

Tabela 3. Métodos e técnicas analíticas empregadas na determinação de antimicrobianos em produtos de origem animal.

Análitos	Matriz	Preparo da amostra	Coluna e fase móvel	Técnica analítica	Referência
Nisina	Queijos	Pesa-se 2,5 g de amostra seguido da adição de 70 mL de solução de ácido fórmico 0,5 %. Leva-se ao banho de ultrassom a 80°C por 30 min. Agitação orbital a 80°C por mais 10 min. Centrifuga-se por 10 min. e filtra com filtro de 0,45 µm.	PLRP-S (polímero de poliestireno-divinilbenzeno de 150 mm x 2 mm, 300 Å, 3 µm). Fase A- 0,1 % ácido fórmico e 0,02 % ácido trifluoracético Fase B- ACN com 0,1% ácido fórmico e 0,02% trifluoracético	LC-MS	ISO/TS 27106:2009
Ácido sórbico	Produtos lácteos	Pesa-se 20g de amostra seguido da adição de 25 mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L ⁻¹ . Leva-se ao banho a 70°C por 15 min. Precipita-se as proteínas e a gordura com solução de ferrocianeto de potássio e acetato de zinco. Por fim diluição em metanol e filtração utilizando filtro de 0,45 µm.	C18 column (250× 4.0 mm, 3 µm). Método isocrático com fase móvel de metanol e tampão fosfato pH 6,7 na proporção 1:9 (v/v). Monitora-se λ- 250 nm.	HPLC-RP	ISO 9231:2008

Continuação tabela 3.

Nisina, natamicina e ácido sórbico	Queijos	Pesa-se 2g de amostra com seguida adição de 30 mL de solução tampão (NaCl 1 mol L ⁻¹ em 0,1 M) com metanol, na proporção de 2:1 (v/v). Agita-se por 1 min seguido de banho de ultra-som por mais 10 min. Centrifuga-se e filtra com filtro de 0,45 µm.	C8 (150 x 4,6 mm, 300 Å, 5µm).	Fase A- 0,05% ácido trifluoracético. Fase B- ACN com 0,05% ácido trifluoracético.	LC-MS/MS Fuselli et al., (2012).
Ácido sórbico e natamicina	Iogurte	Fuselli et al. (2012).	C18 column (250× 4.6 mm, 4 µm).	Fase A- 0,05% ácido trifluoracético. Fase B- ACN com 0,05% ácido trifluoracético. Monitora-se λ- 261nm para ácido sórbico e 304 nm para natamicina.	ESFANDIA RI et al., 2013
Natamicina e tilosina	Leite	Pesa-se 2,5g amostra com posterior precipitação das proteínas com ACN e agitação. Centrifugação e retirada do sobrenadante. Por fim, filtra-se com filtro 0,45 µm.	C18 150 x 2,1 mm, 1,7 µm.	Fase A- 0,1% ácido fórmico Fase B- Metanol com 0,1% ácido fórmico.	LC-MS/MS Ortelli, et al.,(2009)

Continuação tabela 3.

Nisina	Queijos	<p>Pesa-se 2,5g amostra com posterior adição de 20 mL HCl 0,02 mol L⁻¹ até pH 2.0. Agitação com banho orbital á 98°C. Acerta-se o pH final para 4.6 e filtra com filtro de 0,45 µm.</p> <p>Pesa-se 0,5g amostra com adição de 10 mL metanol com 0,001% ácido fórmico. Agita-se com adição 2 mL água e leva-se a refrigeração á -22°C 24h. Terminado centrifugação e filtração com filtro de 0,45 µm.</p>	<p>C8 150 x 2,1 mm, 300 Å, 3 µm.</p> <p>Fase A- 0,1% ácido fórmico</p> <p>Fase B- ACN com 0,1% ácido fórmico.</p> <p>C18 150 x 3,2 mm, 5 µm.</p> <p>Fase A- água</p> <p>Fase B- ACN</p> <p>a-se λ- 291,4; 304,4; 319,4.</p>	<p>LC-MS/MS</p> <p>HPLC-DAD</p>	<p>Shneider, werkmeister, Pischetsrieder (2010)</p> <p>Paseiro-Cerrato et al., (2013)</p>
Nisina	Leite	Fuselli et al., (2012).	<p>CW-C18 50 x 2,0 mm, 3 µm.</p> <p>Diluyente A- 0,1% ácido fórmico.</p> <p>Diluyente B- ACN com 0,1% ácido fórmico.</p>	<p>LC-MS/MS</p>	<p>Ko, Kyung Yuk, et al (2015)</p>
Ácido sórbico	Molhos	<p>Centrifugação dos líquidos com posterior retirada do sobrenadante. Filtra-se com filtro de 0,45 µm. Com molhos, pesa-se 20 g e adição de ácido acético</p>	<p>C18 150 x 2,0 mm, 4 µm.</p> <p>Diluyente A- 5 mM de acetato de amônio com adição de ácido acético</p>	<p>LC-MS/MS</p>	<p>Gören et al., (2015)</p>

adiciona-se 60 mL da fase até pH 4.2.
móvel B com agitação de 3 Diluente B- Metanol com
min. Centrifuga-se e Filtra fase A na proporção 1:1
com filtro de 0,45 µm. (v/v).

Devido à importância do monitoramento dos antimicrobianos visando sua conformidade de uso em alimentos, assim como a carência de métodos analíticos com esse fundamento, o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos tornam-se necessários. A técnica LC-MS/MS é considerada uma técnica seletiva, sensível para a determinação de antimicrobianos e possui a capacidade de conferir medidas simultâneas com confiabilidade.

2.1 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas consiste em uma técnica versátil e de caráter universal (única condição para um composto ser analisado por ms é o mesmo ser ionizável em uma dada fonte de ionização) (iglesias, 2014). A técnica apresenta boa seletividade e sensibilidade em ensaios de baixas concentrações de compostos orgânicos e misturas complexas e também possibilita a obtenção de informações estruturais e da massa molar dos analitos de interesse (lanças, 2009).

Um espectrômetro de massas é constituído basicamente por fonte de ionização, analisador de massa, câmara de colisão e um detector (Figura 5).

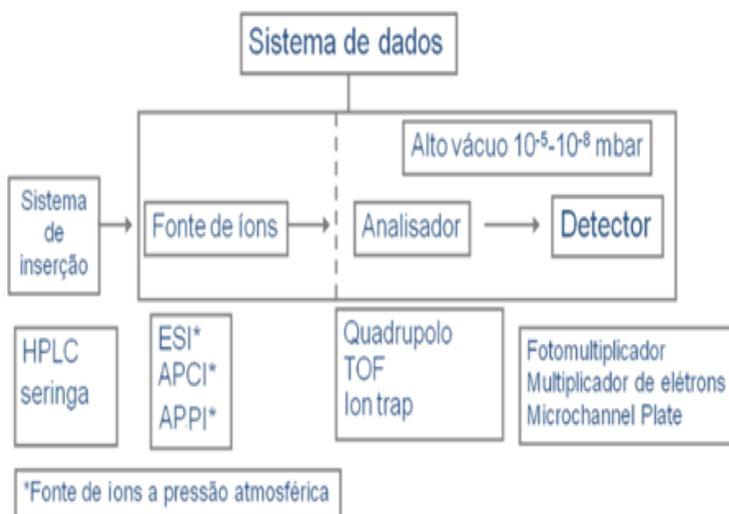


Figura 5. Esquema geral de possibilidades de conformação para um espectrômetro de massa.

Fonte: adaptado de IGLESIAS (2014).

A fonte de ionização é responsável pela conversão dos analitos em fase líquida para íons em fase gasosa, fundamental para qualquer ensaio por MS. Quando se opera em pressão atmosférica, três tipos de ionização são comumente acoplados a um LC, são eles: *electrospray* (ESI, do inglês *electrospray ionization*), ionização química a pressão atmosférica (APCI) e fotoionização a pressão atmosférica (APPI, do inglês *atmospheric pressure photospray ionization*).

A fonte de ionização mais utilizada e estudada para o acoplamento à LC-MS/MS é a de *electrospray* (FENN, 1989; COLE, 1997; YANG et al., 2015; HU, XIANQIAO et al., 2015). Consiste em uma técnica de branda ionização (íons formados com baixa energia interna) e aplicável a uma grande faixa de compostos. É ideal para compostos polares, iônicos e de alto peso molecular, como peptídeos e proteínas. Basicamente, analitos dissolvidos em solventes miscíveis em água (acetonitrila e/ou metanol) são ionizados quando atravessam um capilar metálico aplicado de voltagem. Um fluxo de gás inerte coaxialmente a solução é aplicado, diminuindo as gotas previamente formadas gerando um *spray*. Esse método de ionização permite a formação de íons positivos ou negativos, de acordo com a seletividade da molécula no ensaio (COLE, 1997; HARRIS, 2005).

Dentre os analisadores de massas existentes, os mais populares são o quadrupolo (Q), o aprisionador de íons (IT, do inglês *ion trap*) e os do tipo tempo de voo (TOF, do inglês *time-of-flight*) (LANÇAS, 2009). Analisadores de massa em sequência (MS/MS, do inglês *mass spectrometry in tandem*) são empregados quando a fragmentação de íons passa a ser desejada, conferindo maior seletividade em métodos quantitativos e obtenção de informações estruturais dos analitos.

Analisadores do tipo Q são considerados robustos e são empregados em análises qualitativas e quantitativas. Este tipo de analisador utiliza a condução de moléculas ionizadas, em razão de sua massa/carga (m/z), entre quatro cilindros metálicos (quadrupolo), conectados a fontes de radiofrequência, que fazem com que um determinado número de íons chegue ao detector.

Já os analisadores em modo MS/MS, por sua vez, empregam dois ou mais analisadores de massas, em sequência, onde o íon focalizado por aprisionamento (Q0) é selecionado no primeiro quadrupolo como íon precursor (Q1), analisado e em seguida fragmentado na câmara de colisão (Q2), para posterior análise dos produtos de fragmentação no terceiro quadrupolo (Q3). A possibilidade da seleção de apenas um íon a ser analisado, exclui todos os demais íons gerados no processo de ionização, reduzindo o ruído do sistema e

aumentando a seletividade da técnica (LANÇAS, 2009). Alguns equipamentos com esse tipo de analisador são capazes de fragmentar $MS_{(n)}$, isto é, $MS/MS/MS$ quando se necessita de uma maior especificidade no método ou critérios para elucidação de moléculas. A Figura 6 ilustra a estrutura interna de um espectrômetro de massa do tipo triploquadrupolo *íon trap*, com seus respectivos analisadores de massas capaz de fazer $MS_{(n)}$.

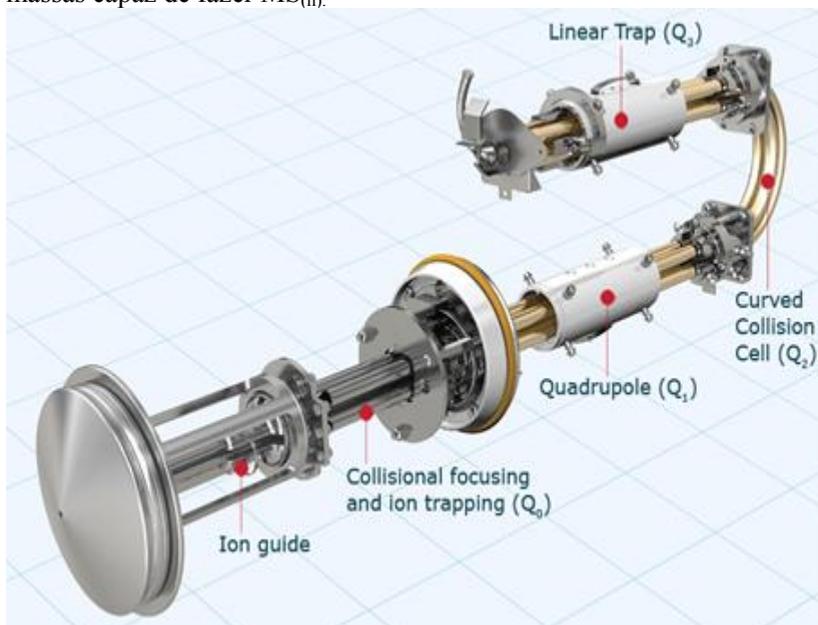


Figura 6. Esquema interno de um espectrômetro de massa, do tipo triploquadrupolo *íon trap*.

Fonte: http://www.chromacademy.com/Mass_Analyzers_Traps_and_TOFs_The_Essential_Guide.html

Após passar pelos analisadores de massas, o detector tem a função de converter feixes de íons em corrente elétrica, passível de ser medido. Os detectores devem ser sistemas com resolução adequada para processar as informações recebidas. Os detectores mais utilizados são: multiplicadores de elétrons, placa de multicanais e fotomultiplicadores.

O acoplamento do espectrômetro de massa em *tandem* com a LC confere grande vantagem, ao unir um sistema de separação robusto e eficiente (separação de 90% dos casos encontrados em análises de alimentos) com um sistema de detecção de alta seletividade e sensibilidade, possibilitando a identificação inequívoca dos analitos

presentes nas amostras ao utilizar os parâmetros de tempo de retenção e espectro de massas (TODESCHINI, 2013).

3 Validação analítica

As diversas etapas envolvidas em um processo analítico são passíveis de erros que podem distorcer os resultados considerados convencionalmente verdadeiros. Independentemente da técnica empregada, a confiabilidade dos resultados gerados deve ser verificada por procedimentos de validação. De acordo com a NBR ISO/IEC 17025 de 2005, validação é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (NBR ISO/IEC 17025:2005). Na prática, a adequação ao uso dos métodos analíticos aplicados a ensaios rotineiros é geralmente avaliada por meio de estudos de validação de métodos.

Entre guias oficiais de validação, podemos citar alguns nacionais como a RDC (Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N°. 216, de 15 de dezembro de 2006), a RE 899 (Resolução –RE N° 899, de 29 de maio de 2003) ambas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o denominado Orientações Sobre Validação de Métodos para Ensaios Químicos (DOQ-CGCRE-008), publicado pelo órgão fiscalizador e a principal referência de processos de medição no Brasil o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade) (ANVISA, 2003; ANVISA, 2014; INMETRO, 2003). Ainda se tratando de guias de validação nacionais, foi publicado pelo MAPA (Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento) o Guia Validação de e Controle da Qualidade Analítica: Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários, com o objetivo de estabelecer procedimentos e parâmetros aos laboratórios pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários (BRASIL, 2011).

Dentre os guias de validação internacionais, destacam-se os da (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), a segunda versão da rede organizacional europeia EURACHEM e a Decisão 657 da União Europeia (THOMPSON, ELLISON, WOOD, 2002; EURACHEM, 2014; EUROPEAN COMMISSION, 2002).

A Decisão 657 é considerado um guia mais amplo, com grande aceitação internacional. De fato, atualmente, se trata do guia de validação com maior número de publicações envolvendo sua aplicação (PIRARD et al., 2007; SAMANIDOU, NISHA, 2008; DE

BRABANDER et al., 2009; BLASCO, TORRES, PICÓ, 2007; MARAZUELA, BOGIALLI, 2009; MACDONALD, MANNION, RAFTER, 2009; KINSELLA et al, 2009; LUCATELLO et al 2014). Além do prestígio internacional, o guia possui a característica de combinar experimentos, diminuindo tempo, carga de trabalho e gastos envolvidos em processo de validação (EUROPEAN COMMISSION, 2002). O guia também dispõe de abordagens específicas de validação de acordo com a técnica analítica empregada, como por exemplo, validação utilizando a técnica de LC-MS/MS (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

De acordo com os critérios da Decisão 657, a validação dos métodos analíticos quantitativos empregando a técnica de LC-MS/MS, devem seguir os procedimentos convencionais de validação em termos de seletividade/especificidade, robustez/estabilidade, veracidade/recuperação/exatidão, precisão e linearidade. Os limites analíticos, comumente descritos em termos de LOD e LOQ, são baseados no limite de decisão (CC_α) e na capacidade de detecção (CC_β). Na Tabela 4 definem-se os parâmetros de validação de acordo com Decisão 657 (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Tabela 4. Definições dos parâmetros convencionais de validação de acordo com a Decisão 657.

Parâmetro	Definição
Seletividade/Especificidade	Capacidade de um método ser seletivo ao ponto de distinguir a substância a analisar de outras substâncias em potencial a interferir.
Robustez/Estabilidade	Susceptibilidade de um método analítico às pequenas alterações. Podem se relacionar com as condições experimentais das substâncias a analisar, das condições de armazenamento, das condições ambientais e/ou de preparação da amostra em que o método pode ser aplicado tal como apresentado ou com pequenas alterações específicas.
Veracidade/Recuperação/Exatidão	Grau de concordância entre o valor médio de uma longa série de resultados de ensaios e um valor de referência

	aceito como convencionalmente verdadeiro.
Precisão	Grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições (pré-estabelecidas) específicas. O valor da precisão é geralmente expresso em termos de imprecisão e normalmente calcula-se sob a forma de um desvio padrão do resultado do ensaio. Três formas de avaliação são empregadas: repetitividade, reprodutividade intralaboratorial e reprodutividade interlaboratorial.
Linearidade.	Capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito nas amostras, dentro de um intervalo especificado.

Fonte: Adaptado de EUROPEAN COMMISSION (2002).

3.1 limite de decisão (cc_{α}) e capacidade de detecção (cc_{β})

O limite de decisão (cc_{α}) e a capacidade de detecção (cc_{β}) são parâmetros definidos na decisão 657 que medem o desempenho do procedimento analítico e auxiliam na interpretação dos resultados. Leva-se em consideração a incerteza de medição no nível de concentração ao qual se toma alguma decisão, o chamado nível de interesse. Essa incerteza de medição abrange a variabilidade do sistema, causado por efeitos randômicos gerados por analistas e equipamentos em faixas de concentrações específicas (european commission, 2002).

Para ensaios físico-químicos de substâncias ao qual foram preconizados LR, como, por exemplo, os antimicrobianos ácido sórbico, natamicina, nisina e tilosina em produtos lácteos, deve-se calcular o limite de decisão (CC_{α}) e a capacidade de detecção (CC_{β}).

O CC_{α} é o limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro α , que é a probabilidade da amostra analisada ser conforme, apesar de ter-se obtido um resultado não conforme. Já o CC_{β} é o teor mais baixo da substancia que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro β , que é a probabilidade da amostra

analisada ser na realidade não conforme, apesar de ter-se obtido um resultado conforme (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Os ensaios laboratoriais devem apresentar um limite mínimo de desempenho requerido (LMDR), definido como a concentração mínima que determinado método deve estar apto a quantificar, ou um limite máximo de analito, expresso como limite regulatório (LR), definido como a concentração máxima de analito admissível em uma determinada matriz. O LMDR deve ser aplicado para ensaios de substâncias banidas na matriz (ALBANO, RAYA-RODRIGUEZ, 2009). Além da obtenção do LMDR e do LMR, o laboratório deve aplicar o estudo da estimativa da incerteza de medição utilizando um método adequado.

4 Incerteza de medição em processo analítico

A estimativa da incerteza de medição em processo analítico não é requerida no protocolo de validação da Decisão 657, já que as decisões são tomadas levando em consideração somente os níveis de interesse. Entretanto, a confiabilidade dos resultados em qualquer faixa de quantificação de um método também é de fundamental importância. Diversos setores da indústria, da saúde e áreas do meio ambiente utilizam de medidas realizadas em laboratórios para que sejam tomadas decisões de produzir, modificar, fiscalizar ou controlar um processo (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2000; CHUI; ZUCCHINI; LICHTIG, 2001; TRAPLE, 2014; THEODOROU; ZANNIKOS, 2014). Além da interpretação dos resultados e conclusões que, sem dúvida, irão subsidiar uma tomada de decisão, com o estudo da incerteza de medição, os analistas ganham conhecimento detalhado do método e suas medidas adquirem confiabilidade metrológica (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2000).

Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia (2008) define-se a incerteza de medição como um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídos ao mensurando (BIPM, IEC et al. 2008). O cálculo da incerteza de medição modela estatisticamente o processo de medição, considerando todas as variáveis de medição e as suas características para determinar o resultado final do modelo, explicitando a extensão e a natureza da sua exatidão (ISO GUIDE 98:1995).

Um estudo de validação produz dados de desempenho global de um método que pode ser aplicado no cálculo da incerteza de medição (ISO GUIDE 98:1995). Desse modo são determinados os parâmetros para interpretação de resultados, como o CC_α e CC_β . Já para a determinação da incerteza de medição em processo analítico, além dos estudos de validação ao qual geram variáveis para o cálculo, pode-se considerar outras fontes de incerteza, entre elas: erros de amostragem, processos analíticos de pesagem, de diluição, impureza de padrões, interpolação do sinal analítico em curvas de calibração, resolução de equipamentos, incertezas de instrumentos de medida, entre outras (SAVIANO; MADRUGA; LOURENÇO, 2015).

4.1 Etapas da estimativa da incerteza de medição

O cálculo da incerteza de medição pode ser simples em seu princípio quando dividido em etapas, como: modelagem do mensurando, identificação e avaliação das incertezas-padrão, determinação da incerteza-padrão combinada e expandida e o relato da incerteza global (iso guide 98:1995).

4.1.1 Modelagem do mensurando

Na maioria dos métodos analíticos desenvolvidos, o analito (mensurando) não é medido diretamente, mas é determinado através de outras grandezas por uma relação funcional. Nesse caso, o modelo de medição pode ser representado por uma expressão explícita de suas variáveis ao longo do processo analítico de medição (ISO GUIDE 98:1995). A relação entre o mensurando (y) e suas variáveis independentes de medição (x_i), pode ser representada através da equação:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$$

As variáveis também conhecidas como incertezas-padrão de entrada (x_i), também podem representar outros mensurandos e depender de outras grandezas. Isto pode levar a uma complexa relação funcional (f), que talvez seja difícil ser escrita de modo explícito. Portanto, se os dados indicam que a função f não modela estatisticamente a medição no grau imposto pela exatidão requerida do resultado de medição, devem-se incluir outras grandezas de entrada adicionais em f para eliminar esta inadequação (ISO GUIDE 98:1995).

4.1.2 Identificação e avaliação das incertezas-padrão de entrada

A identificação das fontes de incerteza é necessária para a avaliação e posterior quantificação da incerteza de medição utilizando uma modelagem proposta. Pode-se registrar e organizar as fontes de incertezas que são relevantes no estudo utilizando ferramentas da qualidade. O diagrama de causa e efeito, conhecido como diagrama de *ishikawa*, representado na figura 7, consiste de uma estrutura hierárquica que culmina em um único resultado analítico específico (buchmann; sarkis, 2002). As ramificações que levam ao resultado são os efeitos contributivos, que incluem os resultados das medições intermediárias e também outros fatores como os efeitos ambientais, analistas, equipamentos, a matriz, entre outros. Cada ramificação pode ter outros efeitos que afetam o resultado seja ele variável ou constante (ellison; rosslein; williams, 2000).

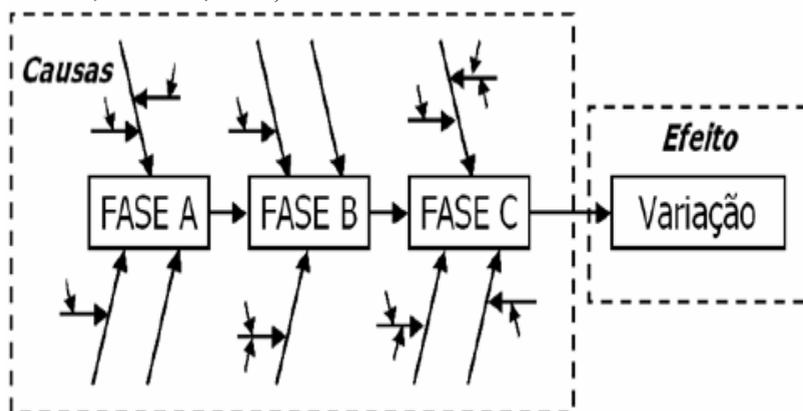


Figura 7. Diagrama de causa e efeito com fases do processo de análise.
Fonte: (BUCHMANN & SARKIS, 2002)

A avaliação das (x_i) podem ser classificadas em dois tipos dependendo da fonte de geração. A incerteza denominada tipo A é aquela obtida por métodos que empregam uma análise estatística de uma série de observações repetidas no momento do ensaio. Ela pode ser expressa por um desvio-padrão experimental da média, por exemplo. Já a incerteza do tipo B é aquela obtida por outros meios que não a análise estatística de uma série de observações repetidas no momento do ensaio. Nesse caso, a avaliação da incerteza tipo B é baseada em outros conhecimentos, tais com: incertezas herdadas dos instrumentos

calibrados, condições ambientais, padrões analíticos, dados históricos de desempenho do método de medição, entre outros (ISO GUIDE 98:1995).

4.1.3 Determinação da incerteza padrão combinada e expandida

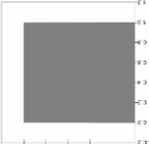
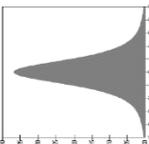
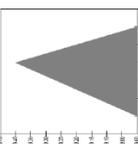
As informações obtidas nas etapas para o cálculo da incerteza de medição consistem de diferentes contribuições quantificadas para a incerteza total, sejam elas associadas a fontes individuais ou aos efeitos combinados de diversas formas (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2000).

As contribuições são expressas na forma de incertezas-padrão (u), para se obter em seguida uma incerteza padronizada combinada (u_c) e com um fator de abrangência apropriado para se chegar à incerteza-padrão expandida (U) (ISO GUIDE 98:1995).

a) Incerteza padrão (u)

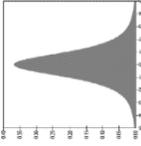
Antes da incerteza padrão combinada, é conveniente expressar todas as contribuições de incerteza como incertezas padrão, isto é, desvios-padrão. Isso envolve a conversão de alguma outra medida de dispersão. A incerteza padrão é a margem cujo tamanho pode ser pensada como “mais ou menos um desvio padrão” (ISO GUIDE 98:1995). Para isso é necessário à classificação das fontes de incerteza avaliando cada fonte individual, como proposto no item 4.1.2, o cálculo de cada fonte de incerteza individual necessita do conhecimento das principais distribuições de probabilidade (Tabela 5), que através de sua devida abordagem incluirá importância aos cálculos (ISO GUIDE 98:1995).

Tabela 5. Tabela das principais distribuições de probabilidade e suas aplicações no cálculo da incerteza padrão de entrada (x_i) .

Quando usar?	Formato da distribuição de probabilidade	Incerteza padrão entrada (x_i)
<p>Quando se conhecem apenas os valores máximos e mínimos de variação ($\pm a$): por exemplo, o erro máximo admissível para um equipamento.</p> <p>Efeito causado pela resolução finita do equipamento utilizado</p>	<p>Distribuição retangular</p> 	$u(x_i) = \frac{a}{\sqrt{3}}$
<p>Quando é feita uma estimativa baseada em observações repetidas de um processo de variação randômica.</p> <p>Incerteza herdada da calibração de equipamentos e padrões.</p>	<p>Distribuição normal ou t-Student, conforme o certificado de calibração</p> 	<p>Valor de k informado no certificado de calibração.</p>
<p>Quando se conhecem os valores máximos e mínimos de variação ($\pm a$) e o valor mais provável: por exemplo, o erro de posicionamento de um instrumento em uma marca de escala.</p>	<p>Distribuição triangular</p> 	$u(x_i) = \frac{a}{\sqrt{6}}$

Quando se tem um desvio padrão da média de um conjunto de N medições repetidas.

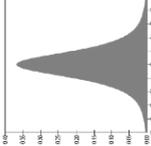
Distribuição t –Student



$$u(x_i) = \frac{a}{\sqrt{N}}$$

Quando se tem um desvio padrão de dados históricos de repetitividade e/ou reprodutividade, na situação em que o resultado do ensaio é obtido por meio de uma única medição e não por uma média.

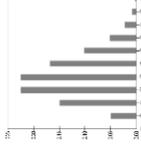
Distribuição t –Student



1

Quando se tem um desvio padrão de um processo de contagem de elementos discretos, com média m e desvio padrão \sqrt{m} .

Distribuição Poisson



1

FONTE: (ISO GUIDE, 98:1995; ELLISON, ROSSLEIN, WILLIAMS, 2000).

b) Incerteza padrão combinada (u_c)

A determinação da incerteza padrão combinada é obtida com a combinação das diferentes incertezas-padrão de saída $u(y_i)$, envolvida no processo de medição global. Sempre terá um nível de confiança de 68% (ISO GUIDE 98:1995).

Utilizando o modelo de medição obtido no item 4.1.1, temos:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$$

A variação do y , em função de cada uma das variáveis infinitesimais de cada um dos x_i , é dada pela diferencial exata de y :

$$dy = \left(\frac{\partial f}{\partial x_1}\right) dx_1 + \left(\frac{\partial f}{\partial x_2}\right) dx_2 + \dots + \left(\frac{\partial f}{\partial x_n}\right) dx_n$$

Onde os $\left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)$ representam as derivadas parciais da função f em relação a cada uma das variáveis de medição de entrada x_i de que depende. Portanto é possível fazer uma analogia entre as diferenciais exatas e os desvios (incertezas- padrão u) das variáveis (Δx_i), uma vez que ambos representam variações. Assim:

$$\Delta y = \left(\frac{\partial f}{\partial x_1}\right) \Delta x_1 + \left(\frac{\partial f}{\partial x_2}\right) \Delta x_2 + \dots + \left(\frac{\partial f}{\partial x_n}\right) \Delta x_n$$

Como se pretende determinar a incerteza de uma medida deve-se considerar a situação na qual as incertezas, atuando no mesmo sentido, propagam-se. Isto só é possível tomando-se o módulo das derivadas parciais na equação anterior. Assim obtemos a equação no seguinte formato:

$$\Delta y = \left|\frac{\partial f}{\partial x_1}\right| \Delta x_1 + \left|\frac{\partial f}{\partial x_2}\right| \Delta x_2 + \dots + \left|\frac{\partial f}{\partial x_n}\right| \Delta x_n$$

As derivadas parciais são chamadas de coeficientes de sensibilidade (c_i), e descrevem o quanto a saída (y) o mensurando é influenciado por suas variáveis de medição (x_i) nas entradas. Contudo pode-se concluir que a incerteza padrão combinada é dada pelas equações abaixo, ambas baseadas numa aproximação da série de Taylor

de $y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$, com base no que se pode denominar lei de propagação de incertezas:

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1,n} \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i)$$

Quando a não linearidade de f é significativa, termos de ordem superior devem ser incluídos na expansão da série de Taylor para a expressão de $u_c^2(y)$, como demonstrado abaixo:

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1,n} \sum_{j=1,n} \left[\frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 f}{\partial x_i \partial x_j} \right)^2 + \frac{\partial f}{\partial x_i} \frac{\partial^3 f}{\partial x_i \partial x_i \partial x_i^2} \right] u^2(x_i) u^2(x_j)$$

c) Incerteza padrão expandida (U)

A incerteza padrão expandida define um intervalo em torno do resultado de uma medição que pode englobar uma grande fração da distribuição de valores atribuídos ao mensurando. A incerteza expandida é expressa com um nível de confiança de aproximadamente 95% ou 99% (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2000).

A partir dos graus de liberdade efetivos (v_{eff}) (número de termos de uma soma menos o número de restrições aos termos da soma), o fator de abrangência (k) é calculado na tabela de t-Student utilizando a fórmula de Welch-Satterthwaite. Quando numericamente predominar a incerteza tipo A, determinar (v_{eff}) da incerteza padrão combinada do mensurando $u_c(y)$:

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{(c_i \cdot u(x_i))^2}{v_i}} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}}$$

Onde: y é o mensurando, $u_c(y)$ é a incerteza padrão combinada, n é o número de grandezas de entrada, $u(x_i)$ é a incerteza padrão das grandezas de entrada tipo A e v_i é o grau de liberdade de cada grandeza (x_i) que é igual ao número de repetições de uma medição menos 1.

Por fim, a incerteza expandida (U) é calculada multiplicando-se a incerteza padrão combinada (u_c) pelo fator de abrangência (K):

$$U = k \cdot u_c(y)$$

4.1.4 Relatando a incerteza de medição

A informação necessária para se relatar um resultado de medição depende primeiramente da intenção de seu uso (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2000). Entretanto, incluindo atividades reguladoras de mercado, desenvolvimento industrial, pesquisa acadêmica e laboratórios nacionais de metrologia, todas as informações necessárias para a reavaliação da medição devem ser apresentadas (ISO GUIDE 98:1995). Portanto, deve-se constar:

- Descrever claramente os métodos utilizados para o cálculo do resultado da medição e a sua incerteza a partir de observações experimentais e dados de entrada;
- Listar todos os componentes da incerteza e documentar amplamente como foi avaliado;
- Apresentar a análise dos dados de tal forma que cada uma das etapas importantes possa ser prontamente seguida e, que os cálculos do resultado relatado possam ser independentes repetidos caso necessário;
- Fornecer todas as correções e constantes utilizadas na análise e suas fontes;
- No relato dos resultados de análise de rotina, pode ser suficiente declarar apenas o valor da incerteza expandida e do coeficiente de abrangência (k).

5 Referências bibliográficas

ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais: guia prático**. Rede Metrológica do RS, Porto Alegre, 2009.

ALBANO, H. et al. Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for “Alheira”, a fermented meat sausage. **Food Control**, v. 20, n. 8, p. 764-770, 2009.

ANDERSON, R. C. et al. Toxicological studies on tylosin: Its safety as a food additive. **Food and cosmetics toxicology**, v. 4, p. 1-15, 1966.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; **Resolução RE n. 899**, de 29/05/2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/360_03rdc. Acesso em 09 de agosto de 2014.

APARICIO, J. F. et al. A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimaricin in *Streptomyces natalensis*. **Chemistry & biology**, v. 7, n. 11, p. 895-905, 2000.

BAIRD-PARKER, A. C. Ácidos orgânicos. In: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Ecologia microbiana de los alimentos 1**. Zaragoza. Espanhola. Acribia (Ed.), 1980, p. 132-142.

BIPM, IEC et al. **The international vocabulary of metrology- basic and general concepts and associated terms** (VIM), JCGM 200:2008.

BLASCO, C.; TORRES, C. M.; PICÓ, Y. Progress in analysis of residual antibacterials in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 9, p. 895-913, 2007.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); Guia de Validação e Controle da Qualidade Analítica: *Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários, Secretaria de Defesa Agropecuária*. MAPA/ACS. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 7 de março de 1996. Regulamento Técnico e Qualidade de Produtos Lácteos. Diário Oficial da União, Brasília, 1996 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº13, de 30 de Novembro de 2004. Regulamento Técnico sobre Aditivos para Produtos Destinados à Alimentação Animal, segundo as boas práticas de fabricação, contendo os procedimentos sobre avaliação da segurança de uso, registro e comercialização, constante dos anexos desta instrução normativa. **Diário Oficial da União**, Brasília; 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº11 de 22 de maio de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 de maio de 2012.

BRASIL. Resolução RDC. nº 253, de 16 de setembro de 2003. Cria Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal-PAMVet. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 90-91, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11 de 07 de maio de 2014. Publica o Subprograma de Monitoramento em carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado para o exercício de 2014, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC, na forma dos Anexos I e II à presente Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, Brasília, 07 maio de 2014. Seção 1, p. 5.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13, de 15 de julho de 2015. Brasília: *Diário Oficial da União*, 2015.

BRUSTOLIN, J. C. **Uso de natamicina no controle do desenvolvimento de fungos em salame tipo italiano. 2009.** Dissertação de mestrado. Disponível em http://cascavel.cpd.ufsm.br/tede/tde_busca/arquivo.php. Acesso em: 10 de agosto de 2014.

BUCHMANN, J. S.; SARKIS, J. E. S. Conceito de incerteza aplicado aos processos de medição associados à preparação de uma solução de referência para calibração. **Química Nova**, V. 25, n. 1, p. 111 – 116, 2002.

BURKIN, M.; GALVIDIS, I. Simultaneous separate and group determination of tylosin and tilmicosin in food stuffs using single antibody-based immunoassay. **Food chemistry**, v. 132, n. 2, p. 1080-1086, 2012.

CEDER, O. Pimaricin- Complete Structure of the Antibiotic. **Acta Chemical Scandinavica**, v.18, p. 126-134, 1964.

CHUI, Q. SH; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por

espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 374-380, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2009). 32nd session. Compendium of methods of analysis identified as suitable to support Codex MRLs. Disponível em: http://www.codexalimentarius.org/standards/vetdrugs/veterinary-drug-detail/en/?d_id=76. Acesso em 09 de agosto de 2014.

COLE, Richard B. **Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, and applications**. Wiley, 1997.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005.

DE BRABANDER, H. F. et al. Residue analysis: Future trends from a historical perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p. 7964-7976, 2009.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin as a food preservative. **Food Australia**, v. 57, n. 12, p. 525-532, 2005.

DEUEL, H. J., JR., CALBERT, C. E., ANISFELD, L., MCKEEHAN, H., & BLUNDEN, H. D. Sorbic acid as fungistatic agent for foods. II Metabolism of b-unsaturated fatty acids with emphasis on sorbic acid. **Food Research**, v.19, n. 1, p. 13-19, 1954.

DENNY, C. B.; SHARPE, L. E.; BOHRER, C. W. Effects of tylosin and nisin on canned food spoilage bacteria. **Applied microbiology**, v. 9, n. 2, p. 108-110, 1961.

DRIDER, D. et al. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.

ELLISON, S. L. R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A. Eurachem/Citac Guide CG 4. Quantifying uncertainty in analytical measurement, 2nd ed. ISBN, v. 948926155, 2000.

ESFANDIARI, Zahra et al. Simultaneous Determination of Sodium Benzoate, Potassium Sorbate and Natamycin Content in Iranian Yoghurt Drink (Doogh) and the Associated Risk of Their Intake through Doogh Consumption. **Iranian Journal of Public Health**, v. 42, n. 8, p. 915-920, 2013.

EURACHEM, Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics: Second edition (2014). **Published by LGC UK (see www.eurachem.org)**, 2014.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, Brussels, 2002, L221/8.

FAO. Animal Production and Health. FAO supports measures to minimize and contain antimicrobial resistance. 2015. Disponível em: http://www.fao.org/ag/againfo/home/en/news_archive/2011_04_AMR.html. Acesso em 07 janeiro de 2015.

FAO/WHO, JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. MEETING. **Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food**. World Health Organization, 2009.

FDA (1975). Teratologic evaluation of FDA 73-4, potassium sorbate, Sorbistat, in mice and rats. PB-245520, Springfield: National Technical Information Service. **US Department of Commerce**.

FDA. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. **Federal Register**, v. 54, p. 11247-11251, 1988.

FENN, John B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

FERREIRA, Rosana Gomes et al. Panorama da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 19, n. 2, p. 30-49, 2012.

FUSELLI, F. et al. Multi-detection of preservatives in cheeses by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 906, p. 9-18, 2012.

GARDE, S. et al. Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese. **International journal of food microbiology**, v. 150, n. 1, p. 59-65, 2011.

GARSA, A. K. et al. Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 6, n. 1, p. 47-58, 2014.

GAUNT, I. F. et al. Long-term toxicity of sorbic acid in the rat. **Food and cosmetics toxicology**, v. 13, n. 1, p. 31-45, 1975.

GÖREN, Ahmet C. et al. HPLC and LC–MS/MS methods for determination of sodium benzoate and potassium sorbate in food and beverages: Performances of local accredited laboratories via proficiency tests in Turkey. **Food chemistry**, v. 175, p. 273-279, 2015.

GRADINARU, A. C., POPESCU, O., SOLCAN, G. Antibiotic residues in milk from Moldavia, Romania. **HVM Bioflux**, 3(2), 133-141, 2011.

GREENBERG, R. A.; SILLIKER, J. H. The Effect of Tylosin on Coagulase-Positive Staphylococci in Food Products. **Journal of Food Science**, v. 27, n. 1, p. 60-63, 1962.

GUARINO, C. et al. Development of an RP-HPLC method for the simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, natamycin and lysozyme in hard and pasta filata cheeses. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1294-1299, 2011.

HANNUKSELA, M.; HAAHTELA, T. Hypersensitivity reactions to food additives. **Allergy**, v. 42, n. 8, p. 561-575, 1987.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. LTC, 2005.

HENDY, R. J. et al. Long-term toxicity studies of sorbic acid in mice. **Food and cosmetics toxicology**, v. 14, n. 5, p. 381-386, 1976.

HOFMANN, A. W. Neue flüchtige Säure der Vogelbeeren. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 110, n. 2, p. 129-140, 1859.

HU, XIANQIAO et al. Fabrication of a polystyrene microfluidic chip coupled to electrospray ionization mass spectrometry for protein analysis. **Journal of Chromatography**, 2015.

IGLESIAS, A. H. Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida Espectrometria de Massas. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/met//minicursos>. Acesso em: 06 de agosto de 2014.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, Março, Rio de Janeiro, 2003.

ISO 9231:2008 (IDF 139:2008). **Milk and milk products- Determination of benzoic and sorbic acid contents. Method by high-performance liquid chromatography on a reversed-phase**. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization. ISO (2008).

ISO 9233:2008 (IDF 140:2007). **Cheese rind and processed cheese. Determination of natamycin content. Method by molecular Absorption Spectrometry and by high-performance liquid chromatography**. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization. ISO (2007).

ISO Guide 98:1995, **Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement**, Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization., 1995, ISBN 92-67-10188-9.

ISO/TS 27106:2009 (IDF/RM 217:2009). **Cheese- Determination of nisin A content by LC-MS and LC-MS-MS**. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization. ISO (2009).

JECFA, 2002. Natamycin. **Evaluation of certain food additives**. Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives,(57th meeting). WHO Food Additives Series 48, pp. 49-76.

JECFA, 2002. **Evaluation of certain food additives**. Fifty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (70th meeting). Roma, Italy.

JECFA, 2008. **Evaluation of certain veterinary drug residues in food**. Seventieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (70th meeting). Geneva, Switzerland.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. EW. Peptide antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

JERKOVICH, A. D.; LOBRUTTO, R.; VIVILECCHIA, R. V. The use of ACQUITY UPLC in pharmaceutical development. **Separation Science Redefined**, p. 15-21, 2005.

JOERGER, M. C.; KLAENHAMMER, T. R. Cloning, expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin. **J.J. Bacteriol.**, v. 172, p. 6339-47, 1990.

JUNG, R. et al. Evaluation of the genotoxic potential of sorbic acid and potassium sorbate. **Food and chemical toxicology**, v. 30, n. 1, p. 1-7, 1992.

JUHLIN, LENNART. Recurrent urticaria: clinical investigation of 330 patients. **British Journal of Dermatology**, v. 104, n. 4, p. 369-381, 1981.

KAISER, A. L.; MONTVILLE, T. J. The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. **Journal of applied bacteriology**, v. 75, n. 6, p. 536-540, 1993.

KALLINTERI, L. D.; KOSTOULA, O. K.; SAVVAIDIS, I. N. Efficacy of nisin and/or natamycin to improve the shelf-life of Galotyri cheese. **Food microbiology**, v. 36, n. 2, p. 176-181, 2013.

KINSELLA, B. et al. New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chemical Acta**, v. 637, n. 1, p. 196-207, 2009.

KO, Kyung Yuk et al. Analysis method for determination of nisin A and nisin Z in cow milk by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of dairy science**, 2015.

KUBO, Isao; LEE, Sang Hwa. Potentiation of antifungal activity of sorbic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4052-4055, 1998.

KUPROVSKYTE, Kristina; PRANAITYTE, Birute; PADARAUSKUS, A. Isocratic HPLC determination of preservatives in beverages. **Chemija**, v. 13, p. 160-163, 2002.

LANÇAS, Fernando Mauro. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas, São Paulo, 2009.

LIICK E. Sorbic acid as a food preservative. **International Flavours and Food Additives** 7, 122-124 and 127, 1976.

LOUREIRO, V.; QUEROL, A. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 11, p. 356-365, 1999.

LUCATELLO, Lorena et al. Development and validation of an LC-MS/MS/MS method for the quantification of fluoroquinolones in several matrices from treated turkeys. **Food Control**, 2014.

MARAZUELA, M. D.; BOGIALLI, S. A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in food stuffs using liquid chromatography based analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 654, n. 1-2, p. 5-17, 2009.

MARTÍNEZ, M. A. et al. Effect of natamycin on cytochrome P450 enzymes in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 281-284, 2013.

MAZDEH, F. et al. Sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in Iranian dough. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 7, n. 2, p. 115-119, 2014.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p. 89-99, 2010.

MCDONALD, M.; MANNION, C.; RAFTER, P. A confirmatory method for the simultaneous extraction, separation, identification and

quantification of Tetracycline, Sulphonamide, Trimethoprim and Dapsone residues in muscle by ultra-highperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry according to Commission Decision 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p. 8110-8116, 2009.

MCGUIRE, J. M. et al. Tylosin, a new antibiotic. 1. Microbiological studies. **Antibiotics and Chemotherapy**, v. 11, n. 5, p. 320, 1961.

MENDES, Marta V. et al. Engineered biosynthesis of novel polyenes: a pimarin derivative produced by targeted gene disruption in *Streptomyces natalensis*. **Chemistry & biology**, v. 8, n. 7, p. 635-644, 2001.

MORAES, A.R.F. et al. Desenvolvimento e avaliação de filme ativo antimicrobiano na conservação de manteiga. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27 (supl.), p.33-36, 2007.

MULDERS, John W. M et al. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. **European Journal of Biochemistry**, v. 201, n. 3, p. 581-584, 1991.

NBR ISO/IEC 17025:2005. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração**, Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Rio de Janeiro, setembro de 2005.

NISHA, A. R. Antibiotic residues-a global health hazard. **Vet World**, v. 1, n. 12, p. 375-377, 2008.

OHTSUKI, Takashi et al. Absolute quantitative analysis for sorbic acid in processed foods using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytica chimica acta**, v. 734, p. 54-61, 2012.

OLIVEIRA, C. P.; SIQUEIRA J. J. P.; SILVA, J. A.. BACTERIOCINAS COMO ALTERNATIVA NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 1, p. 09-15, 2012.

ORTELLI, D. et al. Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography

coupled to time of flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2363-2374, 2009.

PASEIRO-CERRATO, R. et al. Rapid method to determine natamycin by HPLC-DAD in food samples for compliance with EU food legislation. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 262-267, 2013.

PABLO, M. A. et al. Evaluation of immunomodulatory effects of nisin-containing diets on mice. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 35-42, 1999.

PIRARD, C. et al. Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1, p. 116-123, 2007.

RAINVILLE, P.; PLUMB, R. Transfer of the USP Assay for Simvastatin to UPLC. **Ultrapformance LC**, p. 9-11, 2007.

RAJCHL, Aleš et al. Stability of nutritionally important compounds and shelf life prediction of tomato ketchup. **Journal of food engineering**, v. 99, n. 4, p. 465-470, 2010.

RESA, Carolina P. Ollé; JAGUS, Rosa J.; GERSCHENSON, Lía N. Effect of natamycin, nisin and glycerol on the physicochemical properties, roughness and hydrophobicity of tapioca starch edible films. **Materials Science and Engineering: C**, v. 40, p. 281-287, 2014.

RIVIERE, J. E.; PAPICH, M. G. (Ed.). **Veterinary pharmacology and therapeutics**. John Wiley & Sons, 2013.

ROGERS, L. A.; WHITTIER, E. O. Limiting factors in the lactic fermentation. **Journal of bacteriology**, v. 16, n. 4, p. 211, 1928.

ROSS, R.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 3-16, 2002.

SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZA, Maria de Lourdes R. de. Intoxicação alimentar por queijo minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista saúde pública**, v. 22, p. 458-461, 1988.

SAMANIDOU, V.; NISHA, S. Multi-residue methods for confirmatory determination of antibiotics in Milk. **Journal Separation Science**, v. 31, n. 11, p. 2068-2090, 2008.

SAVIANO, Alessandro Morais; MADRUGA, Raquel Omega Gago; LOURENÇO, Felipe Rebello. Measurement uncertainty of a UPLC stability indicating method for determination of linezolid in dosage forms. **Measurement**, v. 59, p. 1-8, 2015.

SCHNEIDER, N. et al. Prevalence and stability of lysozyme in cheese. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 145-151, 2011.

SCHNEIDER, N., WERKMEISTER, K.; PISCHETSRIEDER, M. Analysis of nisin Z and their degradation products by LCMS/MS. **Food Chemistry**, v.127, p. 847-854, 2011.

SCHNEIDER, Nadine; BECKER, Cord-Michael; PISCHETSRIEDER, Monika. Analysis of lysozyme in cheese by immunocapture mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 2, p. 201-206, 2010.

SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos*. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 4, p. 403-411, 2009.

SILVA, E. P.; BERGAMINI, A. M. M.; DE OLIVEIRA, M. A. Alimentos e agentes etiológicos envolvidos em toxinfecções na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil– 2005 a 2008. **Bepa, São Paulo**, v. 7, n. 77, p. 4-10, 2010.

SISMOTTO, Marcela; PASCHOAL, Jonas Augusto Rizzato; REYES, Felix GR. Aspectos analíticos e regulatórios na determinação de resíduos de macrolídeos em alimentos de origem animal por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, v. 36, n. 3, p. 449-461, 2013.

SOFOS, J. N. Antimicrobial agents. In J. A. Maga, & A. T. Tu (Eds.), **Food additive toxicology**, p. 501–529, 1995.

SOFOS, J. N. et al. Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. **International Journal of Food Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1-17, 1986.

SOLIMAN, L.C.; DONKOR, K.K. Method development for sensitive determination of nisin in food products by micellar electrokinetic chromatography. **Food Chemistry**, v. 119, p. 801-805, 2010.

STOPFORTH, Jarret D.; SOFOS, John N.; BUSTA, Francis F. 3 Sorbic Acid and Sorbates. **Antimicrobials in food**, p. 49, 2005.

TE WELSCHER, Y. M. et al. Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 10, p. 6393-6401, 2008.

TFOUNI, S. A. V.; TOLEDO, M. C. F. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. **Food control**, v. 13, n. 2, p. 117-123, 2002.

THEODOROU, D.; ZANNIKOS, F. The use of measurement uncertainty and precision data in conformity assessment of automotive fuel products. **Measurement**, v. 50, p. 141-151, 2014.

THOMPSON, Michael; ELLISON, Stephen LR; WOOD, Roger. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TODESCHINI, B. H. **AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE AGROTÓXICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS E NA REDE PÚBLICA DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA NO RIO GRANDE DO SUL**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

TOLIN, Serena et al. Mass spectrometry detection of egg proteins in red wines treated with egg white. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 87-94, 2012.

TRAPLE, Marcus Augusto Lyrio et al. Measurement uncertainty in pharmaceutical analysis and its application. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2014.

TROLLENIER, H.; DE ARENILLAS, J. R. M. **Antibióticos en medicina veterinaria**. Acribia, 1980.

(UE) União Europeia. Regulamento (CE) no 2821/98 do conselho de 17 de dezembro de 1998. Altera, no que diz respeito à retirada da autorização de certos antibióticos, a Diretiva 70/524/CEE relativa aos aditivos na alimentação para animais. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, n. L351, p. 4-8, 1998.

WALKER, R. Toxicology of sorbic acid and sorbates. **Food Additives & Contaminants**, v. 7, n. 5, p. 671-676, 1990

WHO (2000). **Evaluation of certain food additives**. Technical Report Series, 89.

WREN, S. AC. Peak capacity in gradient ultra performance liquid chromatography (UPLC). **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 38, n. 2, p. 337-343, 2005.

WREN, S. AC; TCHELITCHEFF, P. Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, n. 1, p. 140-146, 2006.

YANG, Yuanzhong et al. Analysis of peptides and protein digests by reversed phase high performance liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry using neutral pH elution conditions. **Analytica Chimica Acta**, 2015.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO SIMULTÂNEO PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO SÓRBICO, NATAMICINA E TILOSINA EM DOCE DE LEITE POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

DEVELOPMENT OF A LC-MS/MS METHOD FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SORBIC ACID, NATAMYCIN AND TYLOSIN IN *DULCE DE LECHE*

Artigo submetido à revista científica Food Chemistry

L. Molognoni^{a, b}, A. C. Valse^{a, b}, A. Lorenzetti^{a, c}, H. Daguer^a, J. De Dea Lindner^b

^a Laboratório Nacional Agropecuário, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, São José, SC 88102-600, Brasil

^b Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis, SC 88034-001, Brasil

^c Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Florianópolis, SC 88040-900, Brasil

RESUMO

Um método rápido com extração simplificada foi desenvolvido e validado para a determinação simultânea de ácido sórbico, natamicina e tilosina por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo tandem em doce de leite, um produto tradicional da América do Sul. Os limites de detecção obtidos foram de 24,41 mg kg⁻¹ para ácido sórbico, 0,10 mg kg⁻¹ para natamicina e 2 µg kg⁻¹ para tilosina. Foram analisadas 35 amostras comerciais provenientes do Brasil, Argentina e Uruguai para verificar a aplicabilidade do método. Embora a tilosina não tenha sido detectada em nenhuma das amostras, foi observada uma elevada taxa de amostras não conformes, com 71% das amostras acima do máximo permitido para o ácido sórbico, com uma concentração média de 920,95 mg kg⁻¹. Proporcionalmente, a padronização interna foi mais eficiente do que a padronização externa, obtendo uma menor incerteza de medição. Este estudo demonstra a

importância de controlar o uso dos conservantes em produtos lácteos e constitui-se uma ferramenta eficiente para a inspeção do uso de natamicina, tilosina e ácido sórbico em doce de leite.

Palavras-chave: avaliação da conformidade, validação de metodologia, incerteza de medição, conservantes, medicamento veterinário, LC-MS/MS.

ABSTRACT

A simple extraction, rapid method for the simultaneous determination of sorbic acid, natamycin and tylosin in *Dulce de Leche*, a traditional South American product, by tandem mass spectrometry-liquid chromatography has been developed and fully validated. The limits of detection were set to 24.41 mg kg⁻¹ (sorbic acid), 0.10 mg kg⁻¹ (natamycin) and 2 µg kg⁻¹ (tylosin). A total amount of 35 commercial samples from Brazil, Argentina and Uruguay have been assessed. Although tylosin was not detected in any sample, a high rate of non-compliant samples was found, with 71% of samples above the maximum allowed for sorbic acid and an average concentration of 920.95 mg kg⁻¹. Proportionally, internal standardization was more efficient than external standard, achieving a smaller measurement uncertainty. This study demonstrates the importance of controlling the use of conservatives in dairy products and provides an efficient tool for the inspection of natamycin, tylosin and sorbic acid in *Dulce de Leche*.

Keywords: conformity assessment, method validation, uncertainty measurement, conservatives, veterinary drug, LC-MS/MS.

1. Introdução

O doce de leite (DL) é um produto lácteo obtido a partir da concentração do leite fluido adicionado de sacarose e outros ingredientes (Hough, Buera, Martinez & Resnik, 1991). O DL é amplamente consumido na América do Sul, especialmente na Argentina, Uruguai, Brasil e Chile (Zalazar e Perotti, 2011). DL também é utilizado como matéria-prima para fabricação de outros produtos de confeitaria e sorvetes (Demiate, Konkel & Pedroso, 2001).

O uso de aditivos em alimentos, tais como os conservantes antimicrobianos, é estritamente regulado por autoridades nacionais e internacionais, dado o potencial risco para a saúde e a segurança dos

consumidores. No Brasil, existe a regulamentação para a utilização de conservantes como ácido sórbico e natamicina em DL nas concentrações de 600 mg kg⁻¹ e 5 mg kg⁻¹, respectivamente, para inibir a ação de leveduras e bolores. A natamicina é um agente antifúngico produzido por fermentação de *Streptomyces natalensis*, e pode ser adicionada somente à superfície do DL, não podendo ser detectada no interior do produto (Brasil, 1996).

Nos anos 60, o antibiótico macrolídeo tilosina foi estudado na aplicação direta em alimentos, a fim de evitar a multiplicação de *Staphylococcus* sp. e *Clostridium botulinum* (Greenberg & Silliker, 1962; Denny, Sharpe & Bohrer, 1961). Atualmente, a utilização de tilosina em alimentos não é permitida em todo o mundo. Estudos têm demonstrado que o consumo regular de alimentos contendo tilosina pode causar efeitos indesejáveis, tais como manifestações alérgicas, citotóxica, efeitos mutagênicos e carcinogênicos nefrotóxicos, distúrbios reprodutivos e o desenvolvimento de micro-organismos resistentes a antibióticos utilizados em terapia humana (Nisha, 2008; FAO, 2015). Agências como USDA (United States Department of Agriculture) e EMA (Agência Europeia de Medicamentos) determinam um limite máximo residual (LMR) de 50 µg L⁻¹ no leite (USDA, 2015; EMA, 2002). Já o Codex Alimentarius e o MAPA determinam um LMR de 100 µg L⁻¹ (Codex Alimentarius Commission, 2009; MAPA, 2015).

Vários métodos utilizando variadas técnicas analíticas têm sido empregados para a identificação e quantificação de conservantes antimicrobianos, como: HPLC-DAD (Paseiro-Cerrato, Otero-Pazosa, Rodríguez-Bernaldo de Quirósa, Sendóna, Angulob & Paseiro-Losada, 2013; ISO 9231: 2008), HPLC-UV (Guarino, Fuselli, La Mantia & Longo, 2011; ISO 9233: 2008), MEKC (Soliman & Donkor, 2010), imunoenensaio enzimático (ELISA) (Burkin & Galvidis, 2012), qHNMR (Ohtsuki, Sato, Sugimoto, Akiyama e Kawamura, 2012), entre outras. Entretanto, a técnica LC-MS/MS é considerada seletiva e sensível, sendo amplamente utilizada para a determinação simultânea dos conservantes em alimentos (Ortelli, Cognard, Jan & Edder, 2009; Schneider, Werkmeister & Pischetsrieder, 2011; Schneider, Werkmeister, Becker & Pischetsrieder, 2011; Fuselli, Guarino, La Mantia, Longo, faberi & Marianella, 2012; Ko, Park, Lee & Kim, 2015).

A utilização de conservantes antimicrobianos em alimentos tem sido amplamente avaliada, mas pela primeira vez no Brasil foi realizada e apresentada uma pesquisa que aborde a determinação quantitativa de ácido sórbico, natamicina, tilosina em DL. Na Espanha, Paseiro-Cerrato et al. (2013) analisaram 26 amostras de alimentos, entre eles produtos

lácteos, detectando natamicina acima do nível permitido. Na Romênia, Gradinaru, Popescu e Solcan (2011) investigaram a presença de resíduos de tilosina no leite durante três anos consecutivos. Verificou-se que a tilosina estava acima do MRL estabelecido pela União Europeia em uma fração significativa do estudo. Assim, é evidente a necessidade de um maior controle sobre o uso desses agentes antimicrobianos em alimentos. A fim de melhorar o controle e monitorar o DL comercializado na América do Sul, este estudo teve por objetivo desenvolver e validar um método analítico por LC-MS/MS para a determinação simultânea de ácido sórbico, natamicina e tilosina.

2. Material e métodos

2.1. Padrões, reagentes e amostras brancas

Natamicina (CAS n ° 7681-93-8) obtida de *Streptomyces natalensis* foi fornecida pela Danisco (DuPont Nutrition and Health, EUA), ácido sórbico (CAS n ° 110-44-1) e tilosina (CAS n ° 1401-1469 -0) foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Alemanha). Cloridrato de robenidina (CAS 25875-50-7), utilizado como padrão interno para a quantificação de natamicina e tilosina, foi obtido da Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Alemanha). Todos os padrões utilizados foram de grau analítico ($\geq 98\%$ de pureza) e os solventes de grau cromatográfico. O metanol utilizado foi fornecido por Tedia Co. (Fairfield, EUA) e a acetonitrila pela Merck KgaA (Darmstadt, Alemanha). Foi utilizado ácido fórmico fornecido por JT Baker Chemical Co. (Phillipsburg, EUA). Água ultrapura foi obtida de um sistema de purificação de água MegaPurity (Billerica, EUA). As soluções-padrão estoques foram preparadas separadamente em concentrações de 1000 mg L^{-1} em metanol. As soluções de trabalho foram preparadas por diluição de cada solução estoque também em metanol. As soluções foram armazenadas a 4°C . As amostras brancas utilizadas foram produzidas na Usina de Processamento de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina e armazenadas a -18°C .

2.2. Extração dos antimicrobianos do DL

Foram pesados $2,0 \pm 0,1 \text{ g}$ de DL diretamente em tubos de polipropileno para centrifuga e posteriormente adicionados 5 mL da solução de ácido fórmico 0,1% em água:metanol (1:9, v/v) a cada tubo. Os tubos foram então submetidos à agitação vigorosa, utilizando um

agitador orbital (Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, Brasil), durante 20 min. Em seguida, foram centrifugados (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA) a 4.000 rpm durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno e, em seguida, foi mantido a -18°C durante uma hora. Os tubos foram novamente centrifugados a 4.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Finalmente, uma alíquota de 100 µl de extrato foi diluída em fase móvel inicial e transferida para um microtubo de polipropileno de 1,5 ml e centrifugado utilizando uma ultracentrífuga (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) a 14.000 rpm durante 20 min. O extrato foi transferido para um vial e injetado no sistema LC-ESI-MS/MS.

2.3. Análise por LC-MS/MS

A cromatografia líquida foi realizada utilizando um sistema HPLC Alliance 2795 (Waters Corporation, Milford, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo Quattro Micro (Waters/Micromass UK Ltd., Manchester, Reino Unido) com ionização por *electrospray* em modo positivo (ESI+) e interface no modo de monitoramento múltiplo de reações (MRM). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Venusil XPB C₁₈ (50 mm de diâmetro x 2,1 mm, 3µm) (Bonna-Agela Technologies Inc., Wilmington, DE, EUA) e coluna de guarda (4,0 mm DI x 3,0 mm, 5 µm) (Phenomenex Inc., Torrance, CA, EUA) mantidas a 30°C por um forno de coluna. A fase móvel consistiu em solução aquosa com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel A) e metanol acidificado com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B). O gradiente linear de eluição foi realizado como se segue: 0-2 min 95% de A; 2-4 min 15% de A; 4-7 min 10% de A; 7-9 min 95% de A com quatro minutos de equilíbrio para a coluna. Foi utilizado um fluxo cromatográfico de 0,3 mL min⁻¹ e um volume de injeção de 10 µL. Nitrogênio de alta pureza foi utilizado como gás de dessolvatação, com fluxo de 600 L h⁻¹. Argônio foi utilizado como gás de colisão. As temperaturas de dessolvatação e da fonte de ionização foram de 130°C e 450°C, respectivamente. O controle do sistema e a aquisição dos dados foram realizados utilizando o software MassLynx versão 4.1 (Waters Corporation, Milford, EUA).

2.4. Validação do método e estimativa da incerteza de medição

A validação do método foi realizada de acordo com os critérios da Decisão 2002/657/CE (Comissão Europeia). Foram também

avaliados o efeito de matriz, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), de acordo com o MAPA (Brasil, 2011). A estimativa da incerteza de medição foi calculada de acordo com o método GUM (ISO GUIDE, 1995).

2.4.1. Curvas de calibração, linearidade e efeito de matriz

As curvas de calibração foram construídas em seis níveis de concentração (incluindo o zero), usando relação função linear de concentração (eixo x) *versus* área do pico (eixo y). A linearidade foi avaliada por meio de três replicatas por nível, em três dias distintos. A robenidina foi utilizada como padrão interno para a quantificação de natamicina e tilosina. O critério de aceitação foi que o coeficiente de regressão médio fosse maior que 0,95. Foi realizada a análise de variância ao nível de 5% de significância para avaliar se havia diferença significativa entre os dias, utilizando-se o software Microsoft Excel 2010.

O efeito de matriz foi avaliado pela construção de três tipos de curvas de calibração. A curva tipo I (curva em solvente) foi preparada pela diluição da solução padrão em fase móvel inicial. A curva tipo II (curva em matriz) foi preparada fortificando-se uma amostra branca com as concentrações adequadas dos padrões, submetendo-se depois à extração como amostras convencionais. A curva tipo III (curva em extrato de matriz branca) foi preparada adicionando-se soluções-padrão a extratos de matriz branca. Adicionalmente, foram comparadas as inclinações das curvas lineares de acordo com Hoff et al. (2015).

2.4.2. Seletividade/especificidade

A especificidade foi avaliada analisando-se 20 amostras, com o objetivo de verificar possíveis interferências endógenas da matriz. Os resultados foram avaliados pela presença de picos interferentes nas proximidades dos tempos de retenção dos analitos, em comparação à amostra branca fortificada.

2.4.3. Recuperação e precisão

A recuperação e a precisão foram avaliadas unindo experimentos. Amostras brancas (18 alíquotas) foram fortificadas em 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o limite regulatório de cada analito. A avaliação foi realizada pelo coeficiente de variação e pela taxa de recuperação. A

precisão foi avaliada em termos de repetitividade e de precisão intermediária, considerando dois analistas e três dias de análise. Foi realizada a análise de variância ao nível de 5% de significância para avaliar se havia diferença significativa entre os dias e os analistas.

2.4.4. Limites analíticos

O limite de decisão (CC_α) e a capacidade de detecção (CC_β) foram calculados a partir da incerteza de medição nos níveis de interesse. CC_α foi calculado a partir da incerteza de medição no nível regulatório. CC_β foi calculado a partir da incerteza de medição no limite de detecção, usando efeitos randômicos observados nos estudos de recuperação e precisão do método. Os limites de detecção foram estabelecidos como a concentração dos analitos que gerou um sinal três vezes maior que a relação sinal/ruído. Os limites de quantificação foram determinados pela concentração dos analitos que gerou um sinal dez vezes superior à relação sinal/ruído com precisão aceitável.

2.4.5. Robustez

A robustez foi avaliada de acordo com o método de Youden (Youden & Steiner, 1975), através do planejamento fatorial fracionário. Sete fatores que poderiam influenciar na rotina do método foram ligeiramente variados e avaliados. Esses fatores foram identificados através de letras e consistiram de: concentração do ácido na fase móvel, concentração do ácido na extração, tempo de congelamento do extrato, proporção de fase móvel inicial para diluição do extrato, tempo de agitação do extrato, temperatura da coluna cromatográfica e a concentração de solvente orgânico para extração.

2.4.6 Estabilidade do extrato

Os extratos foram realizados em triplicata para cada período de 1, 5, 10 e 15 dias de armazenagem sob diferentes condições de temperatura (25°C, 4°C e -18°C). A análise de variância ao nível de 5% de significância foi realizada para determinar diferenças significativas entre as concentrações dos extratos de cada período com os extratos preparados no tempo zero.

2.4.6. Incerteza de medição (IM)

A incerteza de medição foi calculada utilizando dois modelos distintos de medição. No primeiro, foi utilizado um padrão interno (PI) para a quantificação de natamicina e tilosina. Já no segundo, o ácido sórbico foi quantificado utilizando padrão externo (PE). As fontes de incertezas identificadas nos modelos foram: processo analítico da pesagem, diluição, interpolação do sinal analítico em curvas de calibração e a incerteza associada à precisão do método (variabilidade). As incertezas foram calculadas considerando o nível regulatório de cada analito. As equações para o cálculo da concentração de conservantes em mg kg^{-1} , utilizando PI ou PE foram dadas por:

$$C_{\text{conservantes (PI)}} = \frac{\left(\frac{A_{\text{analito}}}{A_{\text{PI}}} - b\right) \cdot C_{\text{PI}} \cdot V}{a \cdot m} + R\&R$$

Onde $C_{\text{conservantes (PI)}}$: concentração do analito na solução estoque (mg kg^{-1}); m : massa de amostras (g); A_{analito} : área do analito (unidade de área (u.a)); A_{PI} : área do PI (unidade de área); C_{PI} : concentração do PI na solução (mg kg^{-1}); V : volume da solução de extração (mL); a : coeficiente angular (unidade de área $\cdot \text{mg}^{-1} \text{ kg}$); b : coeficiente linear (unidade de área) e $R\&R$: repetitividade e precisão intermediária (adimensional).

$$C_{\text{conservatives (PE)}} = \frac{L \cdot V}{m} + R\&R$$

Onde $C_{\text{conservatives (PE)}}$: concentração do analito na solução estoque (mg kg^{-1}); m : massa de amostras (g); V : volume da solução de extração (mL); L : resultado da interpolação na curva de calibração (mg kg^{-1}) e $R\&R$: repetitividade e precisão intermediária (adimensional).

2.4.6.1. Incerteza na pesagem (m)

A incerteza padrão referente à pesagem levou em consideração o erro da excentricidade e a massa indicada na balança. Esta incerteza foi calculada utilizando a incerteza de medição no erro máximo aceitável pelo laboratório, considerando a resolução do instrumento. Essa incerteza foi calculada de acordo com a equação:

$$\begin{aligned}
 u^2(m(Ex_t, M_t, Ex, M)) &= \left(\frac{\partial m}{\partial Ex_t}\right)^2 \cdot (\sigma Ex_t)^2 + \left(\frac{\partial m}{\partial M_t}\right)^2 \cdot (\sigma M_t)^2 + \left(\frac{\partial m}{\partial Ex}\right)^2 \cdot (\sigma Ex)^2 \\
 &+ \left(\frac{\partial m}{\partial M}\right)^2 \cdot (\sigma M)^2
 \end{aligned}$$

Onde u(m): incerteza padrão da pesagem; Ex: erro de excentricidade (g); M: valor indicado na balança (g); t: índice indicativo para o processo analítico de tara da balança; $(\sigma x_i)^2$: incerteza padrão de saída e $\frac{\partial m^2}{\partial x_i}$: coeficiente de sensibilidade.

2.4.6.2. Incerteza no processo de diluição (V)

A incerteza padrão referente aos processos de diluições foram calculados utilizando as incertezas, erros e dados de desempenho dos instrumentos volumétricos. Esta fonte de incerteza foi calculada utilizando a equação:

$$u^2(V(V_{pip}, V_{final})) = \left(\frac{\partial D}{\partial V_{pip}}\right)^2 \cdot (\sigma V_{pip})^2 + \left(\frac{\partial D}{\partial V_{final}}\right)^2 \cdot (\sigma V_{final})^2$$

Onde u(V): incerteza padrão do volume; V_{pip} : incerteza no valor pipetado (mL); V_{final} : incerteza no volume final (mL); $(\sigma x_i)^2$: incerteza padrão de saída e $\frac{\partial V^2}{\partial x_i}$: coeficiente de sensibilidade.

2.4.6.3. Incerteza relacionada à curva de calibração (L, a e b)

A incerteza padrão relacionada à concentração da amostra como resultado da interpolação na curva de calibração (L), utilizando PE e o método dos mínimos quadrados foi calculada por:

$$u(L) = \frac{S_y}{b} * \sqrt{\left[\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(C - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}\right]}$$

Onde u(L): incerteza padrão referente ao resíduo da curva de calibração; S_y : desvio padrão residual (mg kg^{-1}); b: coeficiente angular (unidade de área. mg^{-1}kg); n: número de medidas em x_i ; C: concentração

determinada do conservante (mg kg⁻¹); N: número de medidas determinadas de C; x: valor dos padrões de calibração e i: índice para o número de medições para se obter a curva de calibração.

A incerteza padrão dos coeficientes angular (b) e linear (a) utilizados no modelo PI foram calculados de acordo com as equações:

$$u(a) = \frac{\sigma^2 \sum x_i^2}{N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

$$u(b) = \frac{N\sigma^2}{N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

Onde o formato da equação é $\Delta Y_i = Y_i - a - bx$; $\sigma = \frac{\sum \Delta (Y_i)^2}{N-2}$ e N: o número de medidas determinadas.

2.4.6.4. Incerteza associada à concentração (C_{PI}) e às áreas (A_i)

A incerteza padrão referente à área do analito (A_i) foi calculada de acordo com o item 2.4.6.3. Já a incerteza padrão da concentração do PI (C_{PI}), foi calculada através de uma modelagem composta pelo valor da pureza do padrão, da pesagem e do volume final da solução de estoque utilizada, de acordo com a equação:

$$u^2(C_{PI}(m, p, V_{final})) = \left(\frac{\partial C_{PI}}{\partial m}\right)^2 \cdot (\sigma m)^2 + \left(\frac{\partial C_{PI}}{\partial p}\right)^2 \cdot (\sigma p)^2 + \left(\frac{\partial C_{PI}}{\partial V_{final}}\right)^2 \cdot (\sigma V_{final})^2$$

Onde $u(C_{IS})$: incerteza padrão referente a concentração do PI (mg kg⁻¹); p: incerteza referente a pureza do PI (%); m: incerteza da massa (g); V_{final} : incerteza do volume final (mL); $(\sigma x_i)^2$: incerteza padrão de saída e $\frac{\partial C_{IS}}{\partial x_i}$: coeficiente de sensibilidade.

2.4.6.5. Incerteza associada à variabilidade (R&R)

Esta fonte de incerteza foi calculada utilizando o desvio padrão relacionado com medidas repetidas do padrão controle em condições de repetitividade e de precisão intermediária.

$$u^2(R\&R) = \left(\frac{\partial R\&R}{\partial Rep}\right)^2 \cdot (\sigma Rep)^2 + \left(\frac{\partial R\&R}{\partial Repr}\right)^2 \cdot (\sigma Repr)^2$$

Onde $u(R\&R)$: incerteza padrão combinada da repetitividade e precisão intermediária do método (adimensional); $(\sigma Rep)^2$: desvio padrão da repetitividade; $(\sigma Repr)^2$: desvio padrão da precisão intermediária e $\frac{\partial R\&R^2}{\partial x_i}$: coeficiente de sensibilidade.

2.4.6.5. Incerteza padrão combinada e expandida

A determinação da incerteza padrão combinada foi obtida combinando as incertezas padrões de saída do modelo de medição global correlacionadas. O cálculo foi realizado de acordo com a lei de propagação das incertezas utilizando a equação:

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1,n} \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1,n-1} \sum_{j=i+1,n=1} \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 \left(\frac{\partial f}{\partial x_j} \right)^2 u^2(x_i) u^2(x_j) r(x_i x_j)$$

Onde u_c : incerteza combinada; y : mensurando; $\frac{\partial f}{\partial x_i}, \frac{\partial f}{\partial x_j}$: coeficientes de sensibilidade; $u^2(x_i)$ e $u^2(x_j)$: incertezas padrões de saída de cada variável do modelo de medição global e r : coeficiente de correlação estimado.

Por fim, incerteza padrão expandida (U) foi calculada através da multiplicação da incerteza padrão combinada pelo fator de abrangência (k):

$$U = k \cdot u_c(y)$$

Onde U : incerteza padrão expandida; $u_c(y)$: incerteza padrão combinada e k : fator de abrangência.

2.5. Aplicabilidade do método

A aplicabilidade do método foi avaliada através da análise de 35 amostras reais de DL, contendo 29 marcas comerciais de estabelecimentos inspecionados da Argentina ($n = 3$), Uruguai ($n = 2$) e Brasil ($n = 30$). Para a determinação de natamicina, as alíquotas foram retiradas da superfície e do interior, após homogeneização. Para a determinação da tilosina e do ácido sórbico, foram retiradas alíquotas a

partir de todo o conteúdo homogeneizado. As análises foram realizadas em duplicata.

3. Resultados e discussão

3.1. Extração dos conservantes do DL

DL é uma matriz complexa com altas concentrações de carboidratos, proteínas e gorduras. Assim, foi necessária a utilização de um solvente orgânico em elevada concentração para reduzir a extração de interferentes endógenos. A utilização de metanol com 0,1% ácido fórmico diminuiu a extração dos interferentes e proporcionou uma melhor recuperação dos analitos. O processo de extração combinado com o passo de congelamento levou à precipitação satisfatória das proteínas e, por conseguinte, os extratos ficaram mais claros e de aparência límpida. Procedimentos adicionais para extração da gordura utilizando solventes apolares não foram necessários.

Quando se utiliza um sistema LC-MS/MS, a válvula desviadora pode ser utilizada como um dispositivo para eliminar a interferência de hidratos de carbono, dirigindo o fluxo para a descarga antes da eluição dos analitos. Neste trabalho, a válvula foi mantida aberta durante os cinco minutos iniciais de cada corrida, evitando a contaminação da fonte de ESI e aumentando a eficiência de separação dos analitos, como também observado por Bretanha, Piovezan, Sako, Pizzolati e Micke (2014).

3.2. Otimização da análise por LC-MS/MS

Diferentes métodos utilizando LC-MS/MS para a análise de ácido sórbico têm sido relatados. Acetato de amônio combinado com ácido acético e ácido trifluoroacético (TFA), têm sido utilizados como aditivos para a fase móvel (Fuselli et al., 2012; Gören et al., 2015.). Para análise de natamicina e tilosina, o uso de TFA, ácido fórmico, ácido acético e acetato de amônio têm sido relatados (Ortelli et al., 2009; Fuselli et al., 2012; Bourdat-Deschamps, Leang, Bernet, Daudin & Néliu de 2014 ; Chitescu, Oosterink, de Jong & Stolker, 2012). Neste trabalho, utilizou-se ácido fórmico como aditivo para a análise de ácido sórbico, tilosina e natamicina. Esta é a primeira vez que um estudo utiliza um método para identificar e quantificar esses três compostos simultaneamente em DL. Vários testes foram realizados utilizando solventes orgânicos e aditivos para se obter melhores condições

cromatográficas. A utilização de ácido fórmico a 0,1% em metanol proporcionou a melhor condição.

A otimização do MS/MS foi realizada para se obter a máxima sensibilidade possível. De acordo com Decisão 2002/657/CE, para satisfazer os critérios de confirmação e quantificação de substâncias tais como natamicina, ácido sórbico e tilosina por LC-MS/MS, íons precursores e seus fragmentos são necessários. Com este objetivo, foi realizada a infusão de compostos na concentração de (200 mg L⁻¹) em metanol: solução de ácido fórmico a 0,1% 1: 1 (v/v) para a procura de íons moleculares protonados [MH]⁺ como precursores. Foram monitorados dois fragmentos: o mais intenso foi utilizado para a quantificação e o outro para a confirmação da substância. Foi realizada a otimização dos parâmetros monitorados para cada transição utilizando o ESI-MS/MS (Tabela 1).

Tabela 1. Valores dos parâmetros após o monitoramento múltiplo de reações (MRM) utilizando fonte de eletrospray (ESI) em modo positivo para determinação de conservantes em doce de leite por LC-MS/MS.

Análitos	Tempo de retenção (min)	Ion precursor (m/z)	Fragmentos (m/z)	Energia de colisão (V)	Voltagem do cone (V)
Ácido sórbico		113,2 (1 ⁺) ^a	95,0	10	23
Ácido sórbico	5,90	113,2 (1 ⁺) ^a	66,9	20	23
Natamicina		666,2 (1 ⁺) ^a	503,3	20	15
Natamicina	6,02	666,2 (1 ⁺) ^a	485,0	20	15
Tilosina		916,4 (1 ⁺) ^a	174,3	40	50
Tilosina	5,85	916,4 (1 ⁺) ^a	145,1	42	50
Robenidina (PI)	6,20	334,0 (1 ⁺) ^a	155,0	20	25

^a Estado de ionização da molécula.

3.3. Validação do método

Independentemente da técnica analítica empregada, a confiabilidade dos resultados gerados devem ser verificados por meio de procedimentos de validação (NBR ISO/IEC 17025:2005). Neste trabalho, foi desenvolvido um método para a análise de conservantes em DL e realizada uma validação completa, em que todos os parâmetros foram de acordo com os critérios estabelecidos pela Decisão 2002/657/CE.

3.3.1. Linearidade e efeito de matriz

O método foi linear nas faixas de concentrações de 0 a 200 mg kg⁻¹ (tilosina), 0 a 10 mg kg⁻¹ (natamicina) e de 0 a 1200 mg kg⁻¹ (ácido sórbico). As curvas não mostraram nenhuma diferença significativa na inclinação e no intercepto entre os dias estudados ($p > 0,05$) e os valores dos coeficientes de regressão foram satisfatórios ($R^2 > 0,95$). O estudo das diferentes curvas de calibração mostrou interferências na resposta do analito quando a matriz estava presente. Curva tipo I (solvente), quando comparado com a do tipo III (fortificada antes da extração), provou ter uma inclinação diferente (Figura 1). O efeito de matriz foi confirmado porque a curva do tipo II (fortificada após extração) também apresentou diferença na inclinação quando comparada com a curva I, de acordo com o cálculo apresentado por Hoff et al. (2015), que encontraram valores de ME inferiores a 0,9. Assim, foram adotadas curvas de calibração ajustadas em função da matriz.

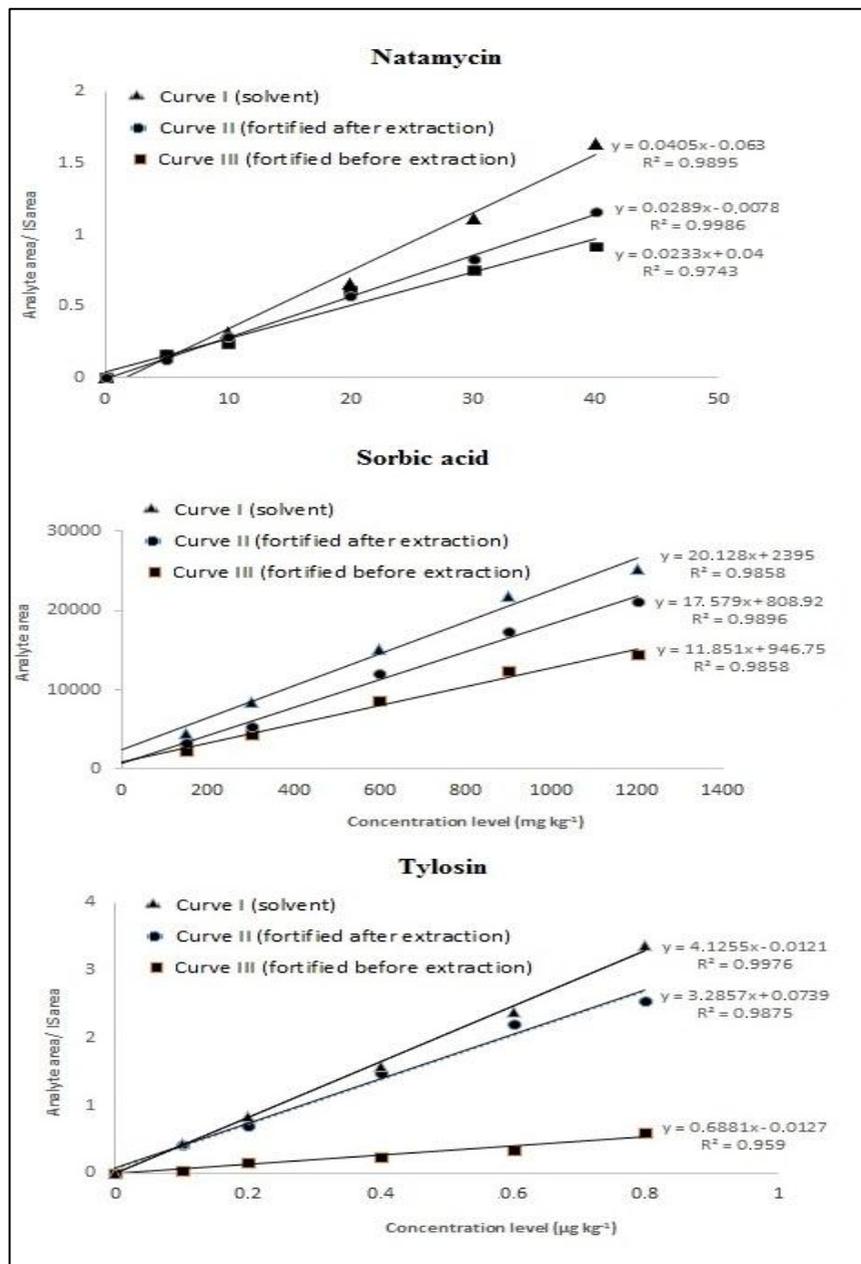


Figura 1. Representação gráfica dos três tipos de curvas de calibração utilizadas para a avaliação do efeito de matriz do doce de leite por análise de LC-MS/MS.

3.3.2. Seletividade/especificidade

Não foi observada interferência nos tempos de retenção dos analitos e o padrão interno, o que mostra que o método não foi afetado pelos compostos endógenos da matriz.

3.3.3. Recuperação, precisão e limites analíticos

Os resultados de exatidão e de recuperação foram satisfatórios com $CV < 16\%$ e recuperações na faixa de -20% a $+10\%$. Os resultados são apresentados na Tabela 2. Não houve diferença significativa entre os resultados dos analistas quando variados os dias dos ensaios ($p > 0,05$).

O CC_α é o limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro α e o CC_β é o mais baixo teor da substância que pode ser quantificado em uma amostra com uma probabilidade de erro β (Comissão Europeia, 2002). Neste trabalho, o CC_β foi estabelecido apenas para o composto tilosina, porque se trata do único resíduo de medicamento veterinário estudado. O CC_α foi estabelecido para todos os compostos, já que todos possuíam limites regulatórios. Baixos limites de detecção e quantificação foram obtidos, mostrando que o método desenvolvido tem boa sensibilidade ao propósito.

Tabela 2. Valores de recuperação, precisão intermediária e limites analíticos da determinação de conservantes em doce de leite por LC-MS/MS.

Análitos	Recuperação (%) e repetitividade (% CV)		Precisão intermediária (% CV)			CC α (mg kg ⁻¹)	CC β (mg kg ⁻¹)	LD (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)	
	0,5RL ^b	1,0RL ^b	1,5RL ^b	0,5RL ^b	1,0RL ^b	1,5RL ^b				
Acido sórbico	96(2.9) ^a	105(2.0) ^a	101(3.9) ^a	7.5	6.0	8.2	687.21	-	24.41	29.05
Natamicina	98(5.0) ^a	95(5.3) ^a	98(4.7) ^a	15.8	10.4	14.0	5.54	-	0.10	0.28
Tilosina	96(5.0) ^a	110(3.9) ^a	109(9.4) ^a	15.8	11.3	17.5	0.12	0.15	0.002	0.007

^a Valores nos parênteses são dados por coeficientes de variação (% CV).

^b Fortificados com 0.5, 1.0 e 1.5 vezes o valor do limite regulatório (LR).

3.3.4. Robustez

De acordo com os critérios do teste de Youden, o método cromatográfico provou ser robusto quando submetido a pequenas variações. O maior efeito foi observado para natamicina (0,6) e tilosina (0,3), quando o tempo de congelamento foi alterado no preparo da amostra. Pode-se concluir que deficiências no *clean-up* da amostra levaram à supressão de sinal, porém em uma intensidade que não foi suficiente para afetar a robustez do método.

3.3.5 Estabilidade do extrato

O estudo de estabilidade demonstrou que, até o quinto dia, todos os extratos foram estáveis a qualquer temperatura, como mostrado na Figura 2. Nos extratos que continham natamicina e ácido sórbico, mantidos à temperatura ambiente até o décimo dia, uma diminuição significativa da concentração foi observada, em comparação com o extrato feito no dia ($p > 0,05$). Por outro lado, a tilosina manteve-se estável. Todos os extratos preparados no 15º dia e submetidos à temperatura ambiente mostraram um decréscimo significativo na concentração ($p < 0,05$).

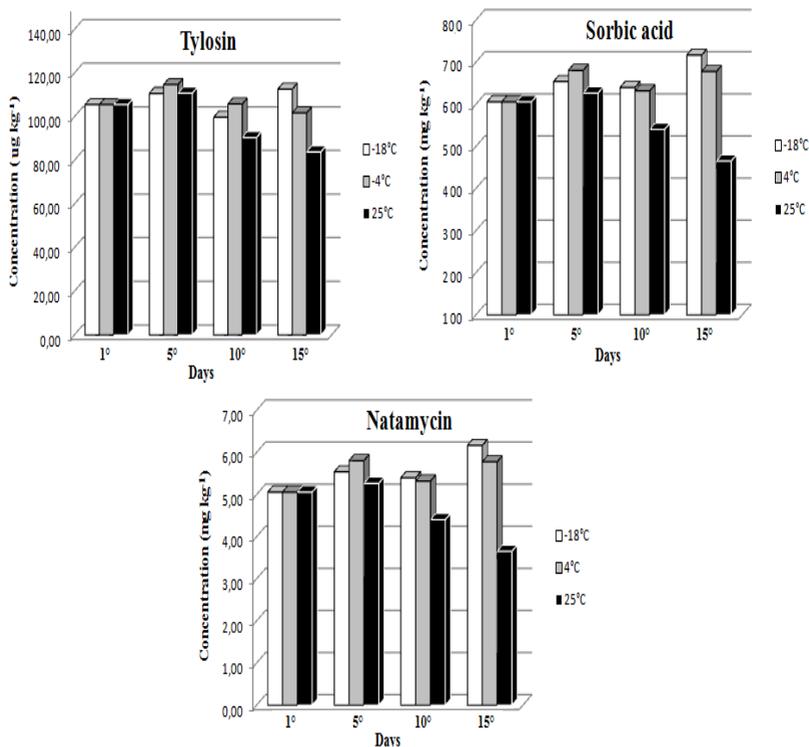


Figura 2. Representação gráfica do ensaio de estabilidade dos extratos para a determinação de conservantes em doce de leite por LC-MS/MS

3.4. Análise das amostras reais

Apesar de ser um produto tradicional da América Latina, a análise de conservantes em DL ainda carece de pesquisas que demonstrem sua conformidade. Neste trabalho, a aplicabilidade do método foi testada em várias amostras comerciais DL (Tabela 3). Observa-se uma elevada taxa de não conformidades, com 71% das amostras acima do máximo permitido para ácido sórbico, com uma concentração média de $920.95 \text{ mg kg}^{-1}$. Vários estudos têm voltado sua atenção para o controle de ácido sórbico em alimentos. Tfouni e Toledo (2002) analisaram vários alimentos do Brasil, e também reportaram não conformidades de ácido sórbico em alguns produtos lácteos. Recentemente, Gaze et al. (2015) avaliaram vários compostos em amostras de DL brasileiro, incluindo a detecção de ácido sórbico.

Apesar de um pequeno número de amostras examinadas, foram relatadas rotulagens não conformes para esse conservante. No entanto, trabalhos recentes não têm se concentrado no uso de ácido sórbico em DL, sob um ponto de vista quantitativo. O ácido sórbico é considerado seguro para o consumo humano, com uma ingestão diária aceitável (IDA) de 25 mg por kg⁻¹ por peso corporal (JECFA, 2002a). Nossos resultados mostram altas concentrações de ácido sórbico, o que demonstra a necessidade de um controle mais rigoroso da utilização desse aditivo no processamento de DL. Apesar da baixa toxicidade do ácido sórbico, casos de intolerância idiossincrática, bem como urticária e alergias, foram relatados (Deuel, Calbert, Anisfeld & Blunden, 1954; Hannuksela & Haahtela, 1987; Juhlin, 1981; Walker, 1990).

A análise de natamicina tem sido amplamente pesquisada em produtos lácteos (Fuselli et al., 2012; Guarino et al., 2011; Ortelli et al., 2009; Paseiro-Cerrato et al., 2013). No entanto, não foram encontradas pesquisas sobre natamicina em DL. Nesta pesquisa, somente duas amostras tiveram resultados quantificáveis na superfície do produto, mas ambas estavam com valores acima do máximo permitido. Além disso, uma vez que a natamicina foi encontrada internamente no DL, parece ter sido indevidamente adicionada à matriz. Essa não conformidade parece ser um problema isolado, porque as amostras eram do mesmo estabelecimento produtor, embora tenha havido um intervalo de três meses entre as datas de fabricação. A natamicina é considerada segura para consumo humano, com uma IDA de 0,3 mg kg⁻¹ (JECFA, 2002b). Estudos sobre toxicidade, utilizando a administração oral de natamicina em animais, alertaram para o cuidado ao se utilizar indevidamente este composto. A utilização de natamicina pode estar relacionada com alterações na resposta imune e efeitos genotóxicos em roedores (Martinez et al., 2013).

Tilosina não foi detectada em nenhuma das amostras. Como o DL é obtido pela concentração de leite fluido, esse pode ser um fator propício ao aumentar da concentração desse resíduo, se estiver presente na matéria-prima. Entende-se que deva existir um controle adequado da utilização dessa substância no tratamento de animais produtores de leite.

Tabela 3. Quantificação dos conservantes em amostras comerciais de doce de leite por LC-MS/MS.

Doce de leite	Conteúdo de conservantes ($\text{mg kg}^{-1} \pm \text{IM}^a$)			
	Ácido sórbico	Natamicina (superfície)	Natamicina (interior)	Tilosina
N.1	730.53 \pm 107.02	<LQ	<LQ	<LQ
N.2	1187.04 \pm 124.82	<LQ	<LQ	<LQ
N.3	828.49 \pm 108.50	<LQ	<LQ	<LQ
N.4	758.64 \pm 107.10	<LQ	<LQ	<LQ
N.5	1610.58 \pm 149.59	<LQ	<LQ	<LQ
N.6	998.93 \pm 109.20	<LQ	<LQ	<LQ
N.7	2105.36 \pm 178.60	<LQ	<LQ	<LQ
N.8	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
N.9	471.63 \pm 100.70	<LQ	<LQ	<LQ
N.10	1016.59 \pm 124.67	<LQ	<LQ	<LQ
N.11	1013.66 \pm 124.65	<LQ	<LQ	<LQ
N.12	998.81 \pm 109.20	<LQ	<LQ	<LQ
N.13	936.19 \pm 109.90	<LQ	<LQ	<LQ
N.14	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
N.15	809.54 \pm 108.32	<LQ	<LQ	<LQ
N.16	660.23 \pm 107.22	<LQ	<LQ	<LQ
N.17	640.38 \pm 107.19	13.91 \pm 0.72	10.86 \pm 0.69	<LQ
N.18	621.54 \pm 107.09	<LQ	<LQ	<LQ
N.19	1280.06 \pm 149.59	<LQ	<LQ	<LQ
N.20	1028.42 \pm 149.20	<LQ	<LQ	<LQ
N.21	719.27 \pm 106.87	<LQ	<LQ	<LQ
N.22	713.80 \pm 106.90	<LQ	<LQ	<LQ
N.23	192.24 \pm 100.96	<LQ	<LQ	<LQ
N.24	849.60 \pm 108.60	<LQ	<LQ	<LQ
N.25	1627.0 \pm 149.60	<LQ	<LQ	<LQ
N.26	1746.02 \pm 149.72	<LQ	<LQ	<LQ
N.27	227.11 \pm 100.96	<LQ	<LQ	<LQ
N.28	897.93 \pm 108.91	<LQ	<LQ	<LQ
N.29	1017.74 \pm 124.67	<LQ	<LQ	<LQ
N.30	586.28 \pm 107.06	12.17 \pm 0.70	9.20 \pm 0.56	<LQ

N.31	762.10 ± 107.13	<LQ	<LQ	<LQ
N.32	451.01 ± 100.68	<LQ	<LQ	<LQ
N.33	856.43 ± 108.61	<LQ	<LQ	<LQ
N.34	762.00 ± 107.13	<LQ	<LQ	<LQ
N.35	816.02 ± 108.48	<LQ	<LQ	<LQ

^aIncerteza de medição (IM) calculada com base em um grau de liberdade efetivo que corresponde a uma probabilidade de fator de abrangência de aproximadamente 95,45%. LQ: limite de quantificação.

3.5. Incerteza de medição (IM)

Com o estudo da incerteza de medição os analistas ganham conhecimento detalhado do método e suas medidas adquirem confiabilidade metrológica (Ellison, Rosslein e Williams, 2000). Neste estudo, o método apresentado no ISO GUIDE (1995) foi adaptado com sucesso para calcular a incerteza de medição de um método cromatográfico. Como pode ser visto na Tabela 4, a maior contribuição de incerteza foi referente à precisão (variabilidade). Não ocorreram resultados quantificáveis para tilosina, assim a incerteza foi avaliada somente para natamicina e ácido sórbico. Foram obtidos valores de incerteza de 11% e 17% em comparação com valores de CC_{α} de 10% e 14% para a natamicina e ácido sórbico, respectivamente. Os valores da IM foram maiores do que os valores de CC_{α} , porque além da contribuição de efeitos aleatórios, incertezas "tipo B" como certificados de calibração, erros e resoluções herdados de equipamentos são consideradas (ISO GUIDE, 1995). Proporcionalmente, o resultado da IM usando o modelo com PI foi menor do que com PE. Neste trabalho, a padronização interna corrigiu de forma mais eficaz a principal fonte de incerteza que foi a variabilidade, determinada a partir de dados de recuperação e precisão. Na cromatografia líquida, a técnica de padronização interna é mais eficaz do que a de padrão externo, porque corrige perdas da substância a analisar em procedimentos de extração (Zenkevich & Makarov, 2007; Pigni, Cialdella, Faranda & Tranfo, 2006; Ding, Peng, Ma & Zhang, 2015).

Tabela 4. Valores das incertezas padrões da determinação de conservantes em doce de leite por LC-MS/MS usando padrão interno (IS) e padrão externo (ES).

Modelagem do padrão externo												
^a Tip o	Variável de medição	Valor da medida	Valor da incerteza	Divisor	^b u(xi)	Unidade de entrada	Distribuição	^c Ci	^d u(yi)	Unidade de saída	^e V _{eff}	Contribuição
B	massa u(m)	2.1000	0.0010	2.02	0.0005	g	t-Student	-680.27	0.3358	mg kg ⁻¹	∞	0.52%
B	volume u(V)	5.00	0.0020	2.02	0.00	ml	t-Student	285.71	0.0000	mg kg ⁻¹	∞	0.00%
A	curva analítica u(L)	600.00	15.9872	2.23	7.17	mg kg ⁻¹	t-Student	2.38	17.0694	mg kg ⁻¹	12.09	26.66%
A	variabilidade u(R&R)	653.18	46.6180	1.00	46.62	-	t-Student	1.00	46.6180	-	17.00	72.82%
					Incerteza combinada (u _c) =				V _{eff} =	17.13		
					Incerteza expandida (U) =							
					Fator de abrangência (K) =							
Modelagem do padrão interno												
^a Tip o	Variável de medição	Valor da medida	Valor da incerteza	Divisor	^b u(xi)	Unidade de entrada	Distribuição	^c Ci	^d u(yi)	Unidade de saída	^e V _{eff}	Contribuição
B	massa u(m)	2.1000	0.0010	2.02	0.0005	g	t-Student	4.866	0.0023	mg kg ⁻¹	∞	0.65%
B	volume u(V)	5.00	0.0000	2.02	0.0000	ml	t-Student	2.044	0.0000	mg kg ⁻¹	∞	0.00%
B	área do analito u(A)	83.00	0.0112	2.00	0.0056	u.a.	t-Student	0.137	0.0008	mg kg ⁻¹	17.00	0.23%
B	concentração PI u(C _{IS})	0.25	0.0002	2.00	0.0001	mg kg ⁻¹	t-Student	40.874	0.0047	mg kg ⁻¹	∞	1.33%

B	área Pl u(A _{IS})	101.00	0.0092	2.00	0.0046	u.a	t-Student	-0.113	0.0005	mg kg ⁻¹	17.00	0.14%	
A	coeficiente linear u(a)	0.0836	0.0107	1.73	0.0062	u.a	retangular	-13.843	0.0854	mg kg ⁻¹	17.00	24.13%	
A	coeficiente angular u(b)	0.043	0.0002	1.73	0.0001	u.a. mg ⁻¹ kg	retangular	237.639	0.0317	mg kg ⁻¹	17.00	8.95%	
A	variabilidade u(R&R)	4.62	0.2286	1.00	0.2286	-		t-Student		1.000	0.2286	12.00	64.58%
					Incerteza combinada (u _c) =	0.25		V _{eff} = 15.89					
					Incerteza expandida (U) =	0.55							
					Fator de abrangência (K) =	2.23							

4. Conclusão

O método desenvolvido neste trabalho tem simplificada extração e um curto tempo de análise cromatográfica (cerca de dez minutos) para a determinação simultânea de natamicina, ácido sórbico e tilosina em DL. Todos os parâmetros de validação ficaram de acordo com os critérios da Decisão 2002/657/CE. O método foi utilizado para analisar várias amostras comerciais, o que demonstra a sua aplicabilidade. A ocorrência de não conformidades em 71% das amostras demonstra a importância de se controlar o uso de conservantes em produtos lácteos. Assim, o método proposto pode ser uma ferramenta eficiente para a inspeção de natamicina, tilosina e ácido sórbico em DL.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada financeiramente pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Projeto de Sagres) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

5. Referências Bibliográficas

Bourdat-Deschamps, M., Leang, S., Bernet, N., Daudin, J. J., & Nélieu, S. (2014). Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction–ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction. *Journal of Chromatography A*, 1349, 11-23.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 7 de março de 1996. Regulamento Técnico e Qualidade de Produtos Lácteos. Diário Oficial da União, Brasília, 1996 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Guia de Validação e Controle da Qualidade Analítica: Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários, Secretaria de Defesa Agropecuária. MAPA/ACS. Brasília, 2011.

Bretanha, L. C., Piovezan, M., Sako, A. F. V., Pizzolati, M. G., & Micke, G. A. (2014). Strategy for a fast and simple method for trace determination of senecionine and senecionine n-oxide in honey using large volume injection in HPLC-MS/MS. *American Journal of Analytical Chemistry*, 5, 681-687.

Burkin, M., & Galvidis, I. (2012). Simultaneous separate and group determination of tylosin and tilmicosin in foodstuffs using single antibody-based immunoassay. *Food Chemistry*, 132, 1080-1086.

Chitescu, C. L., Oosterink, E., de Jong, J., & Stolker, A. A. M. L. (2012). Ultrasonic or accelerated solvent extraction followed by U-HPLC-high mass accuracy MS for screening of pharmaceuticals and fungicides in soil and plant samples. *Talanta*, 88, 653-662.

Codex Alimentarius Commission. Compendium of methods of analysis identified as suitable to support, 32nd session, 2009. URL http://www.codexalimentarius.org/standards/vetdrugs/veterinary-drug-detail/en/?d_id=76 . Accessed 13.02.15.

Demiate, I. M., Konkel, F. E., & Pedroso, R. A. (2001). Avaliação da qualidade de amostras comerciais de doce de leite pastoso-composição química. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21, 108-114.

Denny, C. B., Sharpe, L. E., & Bohrer, C. W. (1961). Effects of tylosin and nisin on canned food spoilage bacteria. *Applied Microbiology*, 9, 108-110.

Deuel, H. J., Jr., Calbert, C. E., Anisfeld, L., McKeehan, H., & Blunden, H. D. (1954). Sorbic acid as fungistatic agent for foods. II Metabolism of b-unsaturated fatty acids with emphasis on sorbic acid. *Food Research*, 19, 13-19.

Ding, M., Peng, J., Ma, S., & Zhang, Y. (2015). An environment-friendly procedure for the high performance liquid chromatography determination of benzoic acid and sorbic acid in soy sauce. *Food Chemistry*, 183, 26-29.

Ellison, S. L., Rosslein, M., & Williams, A. (2000). Quantifying uncertainty in analytical measurement. In *Quantifying uncertainty in analytical measurement*. Eurachem.

EMA. Europe Medicines Agency. The Europe for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Inspections. EMEA/MRL/829/02, 2002. URL http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015767.pdf . Accessed 23.04.15.

European Commission. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Union, L221, (17.8.2002).

FAO. Animal Production and Health. FAO supports measures to minimize and contain antimicrobial resistance, 2015. URL http://www.fao.org/ag/againfo/home/en/news_archive/2011_04_A_MR.html .Accessed 07.04.15.

Fuselli, F., Guarino, C., La Mantia, A., Longo, L., Faberi, A., & Marianella, R. M. (2012). Multi-detection of preservatives in cheeses by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 906, 9-18.

Gaze, L. V., Costa, M. P., Monteiro, M. L. G., Lavorato, J. A. A., Conte Júnior, C. A., Raices, R. S. L., Cruz, A. G., & Freitas, M. Q. (2015). Dulce de Leche, a typical product of Latin America: characterization by physicochemical, optical and instrumental methods. *Food Chemistry*, 169, 471-477.

Gören, A. C., Bilsel, G., Şimşek, A., Bilsel, M., Akçadağ, F., Topal, K., & Ozgen, H. (2015). HPLC and LC–MS/MS methods for determination of sodium benzoate and potassium sorbate in food and beverages: Performances of local accredited laboratories via proficiency tests in Turkey. *Food chemistry*, 175, 273-279.

Gradinaru, A. C., Popescu, O., & Solcan, G. (2011). Antibiotic residues in milk from Moldavia, Romania. *HVM Bioflux*, 3, 133-141.

Greenberg, R. A., & Silliker, J. H. (1962). The Effect of Tylosin on Coagulase-Positive *Staphylococci* in Food Products. *Journal of Food Science*, 27, 60-63.

Guarino, C., Fuselli, F., La Mantia, A., & Longo, L. (2011). Development of an RP-HPLC method for the simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, natamycin and lysozyme in hard and pasta filata cheeses. *Food chemistry*, 127, 1294-1299.

Hannuksela, M., & Haahtela, T. (1987). Hypersensitivity reactions to food additives. *Allergy*, 42, 561-575.

Hoff, R. B., Rubensam, G., Jank, L., Barreto, F., Peralba, M.C.R., Pizzolato, T.M., Días-Cruz, M. S., Barceló, D. (2015). Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: Matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. *Talanta*, 135, 443-450.

Hough, G., Buera, M. D. P., Martinez, E., & Resnik, S. (1991). Effect of composition on non enzymatic browning rate in dulce de leche-like systems. In: *Anales de la Asociación Química Argentina* (Vol. 79, No. 1, pp. 31-40). Sanchez de Bustamante 1749, 1425 Buenos Aires, Argentina: Asoc Quimica Argentina.

ISO 9231:2008 (IDF 139:2008). Milk and milk products- Determination of benzoic and sorbic acid contents. Method by high-performance liquid chromatography on a reversed-phase. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization. ISO (2008).

ISO 9233:2008 (IDF 140:2007). Cheese rind and processed cheese. Determination of natamycin content. Method by molecular Absorption Spectrometry and by high-performance liquid chromatography. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization. ISO (2007).

ISO Guide 98:1995, Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, Geneva, Switzerland: Internation Organization for Standardization., 1995, ISBN 92-67-10188-9.

JECFA, 2002a. Evaluation of certain food additives. Fifty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (70th meeting). Roma, Italy.

JECFA, 2002b. Natamycin. Evaluation of certain food additives. Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, (57th meeting). WHO Food Additives Series 48, pp. 49-76, 2015.

Juhlin, L. (1981). Recurrent urticaria: clinical investigation of 330 patients. *British Journal of Dermatology*, 104, 369-381.

Ko K. Y., Park S. R., Lee C. A., Kim M. (2015). Analysis method for determination of nisin A and nisin Z in cow milk by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 98:1435-1442.

Martínez, M. A., Martínez-Larrañaga, M. R., Castellano, V., Martínez, M., Ares, I., Romero, A., & Anadón, A. (2013). Effect of natamycin on cytochrome P450 enzymes in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 281-284.

NBR ISO/IEC 17025:2005. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração, Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Rio de Janeiro, setembro de 2005.

Nisha, A. R. (2008). Antibiotic residues-a global health hazard. *Vet World*, 1, 375-377.

Ohtsuki T., Sato K., Sugimoto N., Akiyama H., & Kawamura Y. (2012). Absolute quantitative analysis for sorbic acid in processed foods using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytica chimica acta*, 734, 54-61.

Ortelli D., Cognard E., Jan P., & Edder P. (2009). Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877, 2363-2374.

Paseiro-Cerrato, R. R., Otero-Pazosa, P., Rodríguez-Bernaldo de Quirósa, R., Sendóna, R., Angulob, I., & Paseiro-Losada, P. (2013). Rapid method to determine natamycin by HPLC-DAD in food samples for compliance with EU food legislation. *Food Control*, 33, 262-267.

Pigini, D., Cialdella, A. M., Faranda, P., & Tranfo, G. (2006). Comparison between external and internal standard calibration in the validation of an analytical method for 1-hydroxypyrene in human urine by high-performance liquid chromatography/tandem mass

spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 20, 1013-1018.

Schneider, N., Werkmeister, K., Becker, C. M., & Pischetsrieder, M. (2011). Prevalence and stability of lysozyme in cheese. *Food chemistry*, 128, 145-151.

Schneider, N., Werkmeister, K., & Pischetsrieder, M. (2011). Analysis of nisin A, nisin Z and their degradation products by LCMS/MS. *Food chemistry*, 127, 847-854.

Soliman, L. C., & Donkor, K. K. (2010). Method development for sensitive determination of nisin in food products by micellar electrokinetic chromatography. *Food chemistry*, 119, 801-805.

Tfouni, S. A. V., & Toledo, M. C. F. (2002). Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. *Food control*, 13, 117-123.

USDA. United States Department of Agriculture. Maximum Residue Limit Database, 2015. URL <http://www.mrlatabase.com> . Accessed 12.04.15.

Walker, R. (1990). Toxicology of sorbic acid and sorbates. *Food Additives & Contaminants*, 7, 671-676.

Youden, W. J., & Steiner, E. H. (1975). Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists; statistical techniques for collaborative tests, planning and analysis of results of collaborative tests. In *Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists; statistical techniques for collaborative tests, planning and analysis of results of collaborative tests*. AOAC.

Zalazar, C. A., & Perotti, M. C. (2011). Concentrated dairy products, Dulce de Leche. *Enciclopedia of dairy science*, 2, 874-880.

Zenkevich, I. G., & Makarov, E. D. (2007). Chromatographic quantitation at losses of analyte during sample preparation: Application of the modified method of double internal standard. *Journal of Chromatography A*, 1150, 117-123.

collaborative tests, planning and analysis of results of collaborative tests. In *Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists; statistical techniques for collaborative tests, planning and analysis of results of collaborative tests*. AOAC.

Zalazar, C. A., & Perotti, M. C. (2011). Concentrated dairy products, Dulce de Leche. *Enciclopedia of dairy science*, 2, 874-880.

Zenkevich, I. G., & Makarov, E. D. (2007). Chromatographic quantitation at losses of analyte during sample preparation: Application of the modified method of double internal standard. *Journal of Chromatography A*, 1150, 117-123.

CAPÍTULO 3

A CONTROL METHOD TO INSPECT THE USE OF PRESERVATIVES IN CHEESES AND CREAM BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

Artigo submetido à revista científica *Talanta*

Luciano Molognoni ^{a,b}, Leandro A. S. Ploêncio ^{a,c}, Andressa C. Valesse ^{a,b}, Juliano De Dea Lindner ^b, Heitor Daguer ^{a,d}

^a National Agricultural Laboratory, Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, São José, SC 88102-600, Brazil

^b Food Science and Technology Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88034-001, Brazil

^c Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

^d Federal Institute of Education, Science and Technology of Santa Catarina, São José, SC 88103-310, Brazil

ABSTRACT

In this work, a simplified extraction and short time of analysis method for the simultaneous determination of natamycin, nisin and sorbic acid in cheese and cream by liquid chromatography-tandem mass spectrometry was developed. Full validation was performed in accordance to the 2002/657/EC criteria and method applicability was checked in several samples, aiming to inspect their compliance with regulatory limits. The method was linear in the concentration ranges of 0 to 10 mg kg⁻¹ (natamycin), 0 to 25 mg kg⁻¹ (nisin) and 0 to 20 mg kg⁻¹ (sorbic acid). Samples of the three most consumed types of cheese (fresh, pasta filata and ripened) in Brazil and cream were assessed. A surprising rate of non-compliance was observed, especially among hard grated cheeses, since 80% of samples were above the maximum limit for sorbic acid with an average concentration of 2766.3 ± 10.8 mg kg⁻¹. Moreover, a major non-compliance for cream samples was observed.

Keywords: conformity assessment, method validation, dairy products, measurement uncertainty, food preservatives, LC-MS/MS.

1. Introduction

The deterioration of food due to a wide range of microbiological contamination is a worldwide economic and foodborne problem. The action of bacteria, yeasts and moulds can generate huge losses in the entire food chain. In addition, pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes* can contaminate food, constituting serious risk to the consumers health.²⁸ The addition of antimicrobial preservatives may enable the extension of shelf-life and safety of processed foods, by reducing or even preventing the growth of spoilage and pathogenic microorganisms.

Among the antimicrobial agents used to inhibit microorganisms in dairy products are bacteriocins, polyene macrolides and organic acids.^{24,39} Nisin (E234) is a heat-stable bacteriocin of the lantibiotics class, produced by certain strains of *Lactococcus lactis* and is used in dairy products to inhibit Gram-positive spoilage and pathogenic bacteria and their spores.⁶ Natamycin (E235) is a polyene macrolide antifungal agent produced by aerobic fermentation of *Streptomyces natalensis* and related species.¹ Its use prevents fungal outgrowth on cheese rind. Sorbic acid or its potassium and calcium salts (E200; E202; E203) are used to prevent yeast and mould contamination in processed foods, such as fermented dairy products, without interfering in the action of bacterial starter cultures.²⁹

The use of additives such as antimicrobial preservatives in food is strictly regulated by food authorities, given the potential risk to the health and safety of consumers. In Brazil, the use of nisin and natamycin in cheese should comply the regulatory limit (RL) of 12.5 mg kg⁻¹ and 5 mg kg⁻¹, respectively. However, natamycin use is allowed only on cheese rind (must not exceed 2 mm depth). Sorbic acid has a RL of 1000 mg kg⁻¹.⁴ On the other hand, preservatives are not allowed for the processing of any type of cream.

Different techniques have been employed for the identification and quantification of preservatives in foods, such as high-performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD),³³ HPLC-reverse phase (RP-HPLC),^{13,17} HPLC-ultraviolet-visible detector (HPLC-UV),¹⁸ micellar electrokinetic chromatography (MEKC),³⁵ quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (qHNMR) (Ohtsuki et al., 2012), among others. However, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is considered one of the most selective and sensitive techniques for the determination of preservatives in food.^{12,20,26,34}

In this work, we evaluated different dairy products. Three of them were the most consumed types of cheese (fresh, pasta filata and ripened) in Brazil and the last one was cream. Motivated by the importance and lack of analytical data related to the quantification of antimicrobial preservatives in dairy products in Brazil, we developed a control method for the simultaneous determination of natamycin, nisin and sorbic acid in cheeses and cream commercialized in Brazil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method applicability was checked in several samples, aiming to inspect their compliance with regulatory limits.

2. Materials and methods

2.1. Standards and reagents

Natamycin (CAS n° 7681-93-8) from *Streptomyces natalensis* and nisin (CAS n°1414-45-5) from *Lactococcus lactis* were obtained from Danisco (DuPont Nutrition and Health, MA, USA). Sorbic acid (CAS n° 110-44-1) was obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany). Both standards were of analytical grade purity (98%), except nisin (2.5%). All solvents were chromatographic grade. Methanol was supplied by Tedia Co. (Fairfield, OH, USA) and acetonitrile was supplied by Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Analytical grade formic acid and acetic acid were obtained from J.T. Baker Chemical Co. (Phillipsburg, NJ, USA). Ultra-pure water was obtained from a MegaPurity water purification system (Billerica, MA, USA). Stock solutions for natamycin and sorbic acid were separately prepared for both standards at 1000 mg L⁻¹ in methanol. Stock solution for nisin was prepared at 1000 mg L⁻¹ in acetonitrile and aqueous 0.1% formic acid. Working solutions were prepared by diluting all the stock solutions with methanol. Both stock and working solutions were stored at 4°C.

2.2 Samples and blank samples

In this work, we prepared blank samples for each type of cheese (fresh, pasta filata and ripened). The samples were produced in the Food Processing Plant of the Federal University of Santa Catarina and then freeze-dried at a lyophilizer (Liobrás Comércio e Serviço de Liofilizadores, SP, Brazil) and kept at -18°C until analysis.

Different Brazilian commercial types of cheese were evaluated in this work: fresh (*Minas Frescal*, n = 54); pasta filata (*Muçarela* and *Provolone*, n = 18); ripened (*Parmesão*, *Grana*, *Gouda* and *Prato*, n = 20). Pasteurized and Ultra High Temperature (UHT) cream (20-30% fat, n=12) samples were also assessed. The samples were produced by different state or federal inspected dairy companies from seven different Brazilian states.

2.3 Preparation of processed samples

The samples were processed using a grater and a food processor (Oster, Chicago, USA). For the natamycin assay, samples were divided into two portions, the first containing only the rind and the second with the internal portion of the homogenized sample. For the analysis of sorbic acid and nisin, the whole homogenized sample was used. The samples were stored in polypropylene tube at 4°C until analysis.

2.4 Method of extraction

For the extraction of preservatives, the sample was weighed (2.0 ± 0.1 g) into a 50 mL polypropylene tube. After the addition of 10 mL acetic acid 0.1% in water:methanol (1:9, v/v), the suspension was homogenized with a T18 basic Ultra Turrax (IKA, Staufen, Germany). The suspension was mildly shaken on an orbital shaker (Tecnal Equipamentos para Laboratório, SP, Brazil) for 20 min and then centrifuged (Thermo Fischer Scientific Inc., MA, EUA) at 4.000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatant was transferred to another 15 mL polypropylene tube and then was kept at -18°C for 1 hour. Centrifugation was performed again at 4.000 rpm for 10 min at 4°C. Finally, an aliquot of 10 μ L of extract was diluted in 990 μ L initial mobile phase and transferred to a 1.5 mL polypropylene tube, centrifuged in an ultracentrifuge (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) at 14.000 rpm for 20 min. The extract was transferred to an autosampler vial and then injected onto the LC-MS/MS system.

2.5 Instrumental

For LC-MS/MS analysis, a 5500 QTRAP hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer (Sciex, CA, EUA), equipped with an electrospray ionization (ESI) source (Turbo

IonSpray[®]), working in the positive mode (ESI+) and multiple-reaction monitoring (MRM) mode, was coupled to a 1290 Infinity high-performance liquid chromatograph (HPLC) from Agilent (CA, EUA). The HPLC unit consisted of degasser, binary pump, auto sampler and column compartment. The Analyst software (Applied Biosystems) performed all system control, data acquisition and data analysis. Chromatographic separation was performed using a Zorbax 300SB-C8 column (150 mm x 4.6 mm i.d., 5 μm particle size, 300 \AA) (Agilent Technology, CA, EUA).

2.6 LC-MS/MS analysis

The mobile phase consisted of aqueous solution with 0.1% formic acid (mobile phase A) and acetonitrile acidified with 0.1% formic acid (mobile phase B). The linear gradient elution was performed as follows: 0 – 2 min 95% A; 2 – 4 min 15% A; 4 – 7 min 10% A; 7 – 8 min 95% A, and held for 4 min to equilibrate the column. The column was maintained at 35°C. The flow rate was 0.5 mL min⁻¹ and the injection volume was 10 μL .

The optimization of the mass spectrometer in MRM was first obtained by the infusion of the compounds separately in the ESI-MS/MS, in a continuous flow of 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ at concentrations of 5 to 150 $\mu\text{g L}^{-1}$. The optimization of the ESI source in positive mode was carried out by flow injection analysis (FIA) using the nisin standard at 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, since it was the analyte with lower sensitivity.

2.7 Method validation

Full validation was performed in accordance to the 2002/657/EC criteria.¹⁰ The validation of the method was performed for each analyte using three types of cheese and cream as matrices. Each calibration curve was built with six concentration levels (including zero) using a linear function of concentration (x) *versus* peak area (y). Linearity was evaluated using three replicates per level, in three different days. The acceptance criterion was that the average regression coefficient (R^2) should be greater than 0.95.

Specificity was checked by analysis of at least 20 samples of each matrix, to evaluate the possible interference of the endogenous compounds for each category of samples. The results were assessed by

the presence of interfering substances in the surrounding of the analytes retention times compared to the fortified blank sample.

The recovery and precision were determined by binding experiments. Blank samples (18 aliquots) were fortified at 0.5, 1 and 1.5 times the regulatory limit of each analyte and assessed for each type of matrix. For the cream matrix and natamycin in fresh cheese, fortification was carried out at 1, 1.5 and 2 times the minimum required performance limits (MRPL) of each analyte. The evaluation was performed using the coefficient of variation (CV) and the recovery rate. Repeatability was assessed in terms of intra-day, inter-day and intermediate precision considering different analyst ($n = 2$) and day of analysis ($n = 3$). Analysis of variance was carried out to determine whether there are significant differences between days and analysts at 5% significance level. Statistical analyses were performed using the Microsoft Office 2010 software.

Both decision limit (CC_α) and detection capability (CC_β) were calculated from the measurement uncertainty at interest levels. CC_α was calculated as the measurement uncertainty of the regulatory level. CC_β was calculated as the measurement uncertainty of the MRPL, using random effects obtained in recovery and precision determined. The limits of quantification (LOQ) were set for each combination matrix vs. analyte as the first point of the respective calibration curve, after demonstrated its linearity. The limits of detection (LOD) were established as the concentrations of the analyte which signal were ten times lower than respective limit of quantification.

The ruggedness was evaluated by the Youden approach (Youden & Steiner, 1975), by using the fractional factorial design.³⁸ Seven factors that could influence the routine method were slightly varied. These factors have been identified with letters and consisted of: acid concentration in the mobile phase; acid concentration in the extraction; extract's freezing time; proportion of initial mobile phase to dilute an aliquot of the extract; extract's stirring time; temperature of chromatographic column; concentration of organic solvent in extraction. Finally, the deviation of the ruggedness was compared with the deviation of the intermediate precision for each analyte. To be considered rugged, the deviation due to the ruggedness should be smaller.

2.8 Matrix effects

Additionally, matrix effects were also evaluated according to validation protocols of the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply.³ Matrix effect was assessed by building three types of calibration curves. Curve type I, called 'solvent', was prepared by diluting the standard solution in the mobile phase initial composition. Curve type II, called 'matrix matched', was prepared by fortifying blank sample before extraction with the desired amounts, which were extracted and analyzed as conventional samples. Curve type III, or 'tissue standard curve', was prepared by adding the standard solution to extracts of blank samples after extraction. Additionally, effects from matrix co-extractives were investigated by comparing slopes obtained in the linear calibration curves according to literature.¹⁶ No matrix effect was considered if the slopes ratios were between 0.9 and 1.2.

2.9 Stability test

Extracts were processed in triplicate for each period of 1, 5, 10 and 15 days under different temperature storage conditions (25°C, 4°C and -18°C). The standard solutions were evaluated in each period of 60, 30, 10 and 5 days storage under different temperature conditions (25°C, 4°C and -18°C). The stability of the stock solution and the working mix solution was evaluated for each analyte. Analysis of variance at 5% significance level was carried out to determine whether there were significant differences between concentrations of the extracts and standard solutions prepared at each period and the freshly prepared ones.

2.10 Measurement uncertainty (MU)

The MU was calculated according to the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement.¹⁹ The MU was calculated using external standard (ES) model for the quantification of natamycin, nisin and sorbic acid. The sources of uncertainty identified were: weighing; dilution; interpolation of the analytical signal in the calibration curve; uncertainty associated to the precision of the method. Uncertainties were calculated considering regulatory level for each compound.

The equation for calculating the concentrations of preservatives in mg kg⁻¹ using ES is:

$$C_{preservatives} = \frac{L \cdot V}{m} + R\&R$$

Where $C_{preservatives}$: concentration of analyte in stock solution (mg kg^{-1}); m : weight of sample (g); V : volume of extractive solution (mL); L : result from the linear calibration curve (mg kg^{-1}) and $R\&R$: intra-day and inter-day precision (dimensionless).

2.9.1 Uncertainty in the weighing (m)

The standard uncertainty regarding weighing took into consideration the error of eccentricity and those displayed by the balance. This uncertainty was calculated using the uncertainty in the maximum error accepted by the laboratory, considering the resolution of the balance. This uncertainty was calculated using the following equation:

$$\begin{aligned} u^2(m(Ex_t, M_t, Ex, M)) &= \left(\frac{\partial m}{\partial Ex_t}\right)^2 \cdot (\sigma Ex_t)^2 + \left(\frac{\partial m}{\partial M_t}\right)^2 \cdot (\sigma M_t)^2 + \left(\frac{\partial m}{\partial Ex}\right)^2 \cdot (\sigma Ex)^2 \\ &+ \left(\frac{\partial m}{\partial M}\right)^2 \cdot (\sigma M)^2 \end{aligned}$$

Where $u(m)$: standard uncertainty in weighing; Ex : eccentricity error value (g); M : mass measured in the balance (g); t : index to represent the analytical process tare balance; $(\sigma x_i)^2$: output standard uncertainty and $\frac{\partial m^2}{\partial x_i}$: sensitivity coefficients= 1.

2.9.2 Uncertainty in the dilution analytical process (V)

The standard uncertainty regarding the dilution was calculated taking into account uncertainties, errors and performance data of volumetric instruments. This source of uncertainty was calculated using the following equation:

$$u^2(V(V_{pip}, V_{final})) = \left(\frac{\partial D}{\partial V_{pip}}\right)^2 \cdot (\sigma V_{pip})^2 + \left(\frac{\partial D}{\partial V_{final}}\right)^2 \cdot (\sigma V_{final})^2$$

Where $u(V)$: standard uncertainty regarding the dilution; V_{pip} : pipetted volume (mL); V_{final} : final volume (mL); $(\sigma x_i)^2$: output standard uncertainty and $\frac{\partial V^2}{\partial x_i}$: sensitivity coefficients.

2.9.3 Uncertainty in the calibration curve (L)

The standard uncertainty related to the concentration of the sample as a result of interpolation on the calibration curve (L) by the method of least squares using ES was calculated by:

$$u(L) = \frac{S_y}{b} * \sqrt{\left[\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(C - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \right]}$$

Where $u(L)$: standard uncertainty regarding the calibration curve; S_y : residual standard deviation (mg kg^{-1}); b : angular coefficient (area unit $\text{mg}^{-1} \text{kg}$); n : number of measurements for the calibration; C : determined preservative concentration (mg kg^{-1}); N : number of measurements to determine C ; \bar{x} : mean value of the different calibration standards; n : number of measurements and i : index for the number of measurements to obtain the calibration curve.

2.9.4 Uncertainty associated to R&R

This source of uncertainty was calculated using the standard deviation related to repeated measurements of the standard through intra-day and inter-day precision.

$$u^2(R\&R) = \left(\frac{\partial R\&R}{\partial Rep} \right)^2 \cdot (\sigma Rep)^2 + \left(\frac{\partial R\&R}{\partial Repr} \right)^2 \cdot (\sigma Repr)^2$$

Where $u(R\&R)$: standard uncertainty regarding the repeatability combined with intra-day and inter-day; $(\sigma Rep)^2$: standard deviation of intra-day precision; $(\sigma Repr)^2$: standard deviation of inter-day precision and $\frac{\partial R\&R^2}{\partial x_i}$: sensitivity coefficients= 1.

2.9.5 Combined and expanded standard uncertainty

The determination of the combined standard uncertainty was obtained by combining the correlated output standard uncertainties in the overall measurement model. The calculation was performed according to the propagation of uncertainty using the following equation:

$$u_c^2(C(m, V, L, R\&R)) = \left(\frac{\partial C}{\partial m}\right)^2 \cdot (\sigma m)^2 + \left(\frac{\partial C}{\partial V}\right)^2 \cdot (\sigma V)^2 + \left(\frac{\partial C}{\partial L}\right)^2 \cdot (\sigma L)^2 + \left(\frac{\partial C}{\partial R\&R}\right)^2 \cdot (\sigma R\&R)^2 + 2 \cdot \left(\frac{\partial C}{\partial V}\right) \cdot (\sigma V) \cdot \left(\frac{\partial C}{\partial L}\right) \cdot (\sigma L) \cdot r_{V, L}$$

Where u_c : combined standard uncertainty; C : measuring; $\frac{\partial f}{\partial x_i}$, $\frac{\partial f}{\partial x_j}$: sensitivity coefficients; m, V, L and $R\&R$: the measurement global model variables; $(\sigma x_i)^2$ and (σx_j) : uncertainty standard output of each variable the global model and $r_{i,j}$: estimated correlation coefficient.

The expanded uncertainty (U) was calculated by multiplying the combined standard uncertainty by the coverage factor (k) according to the following equation:

$$U = k \cdot u_c(C)$$

Where U: standard uncertainty expanded; $u_c(y)$: combined standard uncertainty and k: coverage factor.

2.10 Method applicability

After validation, the LC-MS/MS method was applied for routine analyses of natamycin, nisin and sorbic acid in different types of cheese and cream. The results were compared to the current regulation in order to inspect compliance of the use of preservatives.

3. Results and discussion

3.1. Method of extraction

To perform the simultaneous detection of natamycin, nisin and sorbic acid in cheese and cream, the extraction method must be capable of effectively extracting each preservative from complex samples. The extraction procedure is a critical step, since it must be able to perform a good recovery of several compounds with different physicochemical properties.¹² Several methods for the extraction of nisin from dairy products have been reported. Due to its physicochemical characteristics, aqueous extractions have been used, like an aqueous solution of 0.5% formic acid described by the ISO/TS 27106:2009 method²⁰ the 0.02 mol L⁻¹ solution of HCl described by Shneider, Werkmeister and Pischetsrieder,³⁴ or a simple dilution in water.³⁴ However, methods for the simultaneous detection of other preservatives with different physicochemical characteristics have being rarely reported. The use of low concentrations of organic solvent in order to improve the extraction capacity was reported by,¹² In this work, we developed an extraction method with a higher concentration of organic solvent (90%), instead of using an aqueous or a low concentration of organic extraction. The use of methanol:0.1% formic acid in water (9:1, v/v) decreased the extraction of interferents and provided a better recovery of the analytes. This procedure, combined with the freezing step, led to a satisfactory protein precipitation and, therefore, more clear extracts were obtained. Neither buffering nor clean-up, as well as any other additional procedure for fat extraction with nonpolar solvents, were required.

3.2. Optimization of LC-MS/MS analysis

Methods using LC-MS/MS for the analysis of natamycin, nisin and sorbic acid have been reported. Formic acid combined with trifluoroacetic acid (TFA), has been used as additives for the mobile phase.^{12,13,20} Several tests were performed using organic solvents and additives to get the best chromatographic conditions. The use of 0.1% formic acid in acetonitrile provided the best condition. The use of TFA as an additive for the mobile phase promoted signal suppression. The chromatographic method was effective to separate compounds of various physicochemical characteristics using C8 as stationary phase, within a short run time (approximately eight minutes) (Figure 1). The robust and efficient separation coupled with a high selectivity and

sensitivity detection system allowed the unequivocal identification of analytes in complex samples, such as dairy products by the retention time and mass spectrum. When using the LC-MS/MS system, the diverter valve was used as a device to eliminate interferences, directing the flow into the discharge before the elution of the analytes. This valve was kept open during the four initial minutes of each run, avoiding the contamination of the ESI source and increasing the separation efficiency of the analytes.

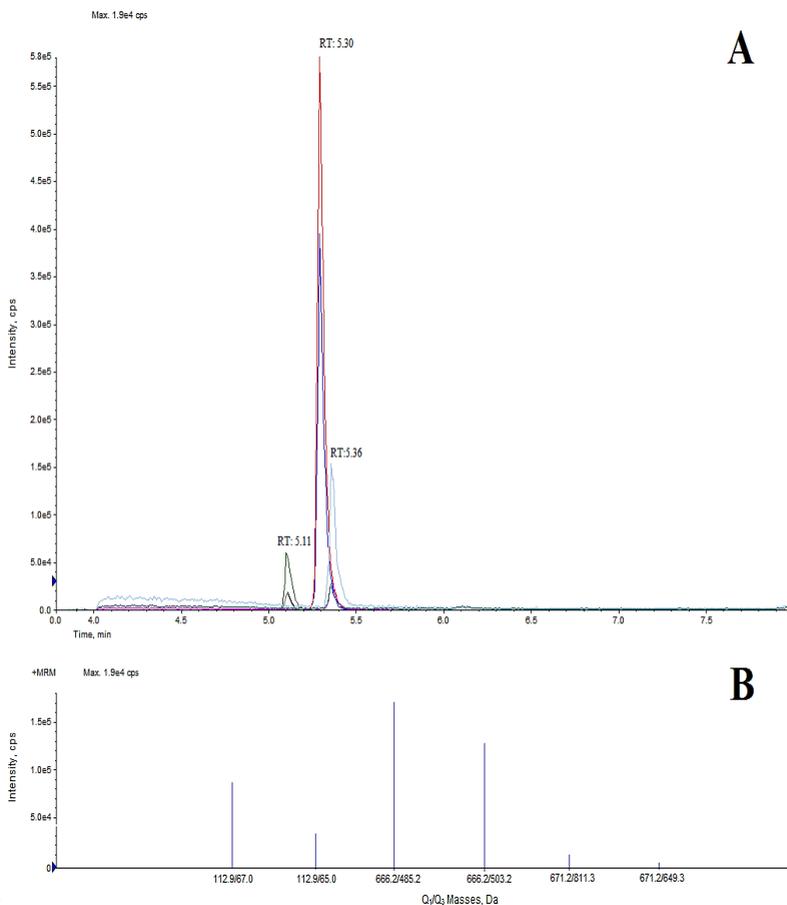
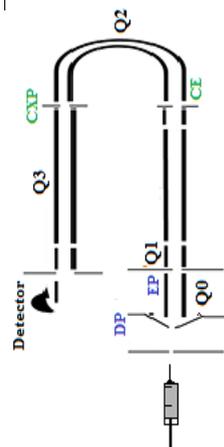
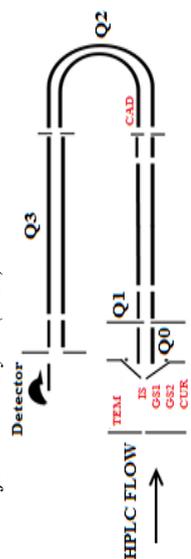


Figure 1. Chromatogram of the three preservatives with retention times in minutes: natamycin (5.30), nisin (5.11) and sorbic acid (5.36) (A) and extract ion chromatograms: natamycin (666.2 Da), nisin (671.2 Da) and sorbic acid (112.9 Da) (B).

The optimization of the mass spectrometer was performed to obtain maximum sensitivity. According to 2002/657/EC, to satisfy the criteria for confirmation and quantification of substances such as natamycin, nisin and sorbic acid by LC-MS/MS, identification of precursor ions and their fragments is necessary. With this goal, the infusion of the compounds was performed for searching protonated molecular ions $[MH]^+$ as precursors. We monitored two fragments. The more intense fragment was used for quantification and the other for confirmation. The optimization of the ESI source in positive mode by flow injection analysis (FIA) using the compound of lower sensitivity (nisin) has increased the method's sensitivity, the atomization's efficiency, as well as it has ensured that no fragmentation of the compounds occurred at the source. The optimization of each parameter carried out in the MS/MS and the optimization of the ESI in positive mode are shown in Table 1.

Table 1. Optimized parameters for the determination of preservatives in the mass spectrometer using electrospray ionization in positive mode with schematic illustration of the Qtrap® hybrid triple quadrupole.

Infusion method		Analyte	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ions (<i>m/z</i>)	^b DP (V)	^c EP (V)	^d CE (V)	^e CXP (V)
		Sorbic acid	112.9 (1 ⁺) ^a	67.0	56	10	19	8
		Sorbic acid	112.9 (1 ⁺)	65.0	56	10	25	8
		Natamycin	666.2 (1 ⁺)	485.2	56	10	21	24
		Natamycin	666.2 (1 ⁺)	503.2	56	10	17	22
		Nisin	671.24 (5 ⁺)	811.3	56	10	23	38
		Nisin	671.24 (5 ⁺)	649.3	56	10	23	30
Flow injection analysis (FIA)		Parameters						
		Source temperature (TEM)	600 (°C)					
		Collision gas (CAD)	High (psi)					
		Voltage applied to the capillary (IS)	4.500 (V)					
		Gas flow nebulizer (GSI)	40 (psi)					
		Gas flow drying (GS2)	45 (psi)					
		Curtain gas (CUR)	15 (psi)					

^a Molecule ionization state. ^b DP- Declustering Potential ^c EP- Entrance Potential ^d CE- Collision Energy ^e CXP- Collision Cell Exit Potential

3.3. Method validation

Regardless of the analytical technique employed, the reliability of the generated results must be verified by validation procedures.³⁰ In this work, we developed a method for the analysis of preservatives in cheese and cream performing a full validation, in which all parameters were in accordance to the criteria established by 2002/657/EC.

3.3.1. Linearity and matrix effect

The method was linear in the concentration ranges of 0 to 10 mg kg⁻¹ (natamycin), 0 to 25 mg kg⁻¹ (nisin) and 0 to 20 mg kg⁻¹ (sorbic acid). The curves performed on three days of validation had satisfactory regression coefficients ($R^2 > 0.95$) (Table 1).

Due to the production aspects (*e.g.* physical and chemical evolution during ripening, heat treatment, fermentation), the matrix effect seems to be related both to the chemical structure of the preservative and the composition of dairy matrix, and may lead to different chemical behaviours which explain a significant difference between each matrix, despite being all dairy products.¹² In these terms, we applied a validation for each matrix. The study of the different calibration curves showed interference in the analyte response when different types of cheese and cream were analyzed. Type I curve (solvent), when compared to type III (fortified before extraction), proved to have a different inclination. The matrix effect was confirmed when the type II curve (fortified after extraction) also showed difference in slope when compared to the curve I, in accordance with the calculation presented by,¹⁶ who found ME values lower than 0.9 or above 1.2 (Table 2).

Table 2. Linearity and matrix effect for the determination of preservatives in cheeses and cream by tandem mass spectrometry-liquid chromatography method.

Preservatives	^a Standard equation	^a Matrix-matched equation	^c Matrix effect
Natamycin		Fresh y= 85919x -1788 (R ² = 0.9980)	0.75
		Ripened y= 65609x -5228 (R ² = 0.9940)	0.57
		Pasta filata y= 46619x - 5945.0 (R ² =0.9970)	0.24
		Cream y= 75795x +48892 (R ² = 0.9970)	0.45
Nisin		Fresh y= 9078.0x +1253 (R ² = 0.9920)	8.87
		Ripened y= 10628x + 6459 (R ² = 0.9990)	10.39
		Pasta filata y= 7473.0x - 8914 (R ² = 0.9900)	7.30
		Cream y= 9188.0x +7536 (R ² = 0.9920)	8.98
Sorbic acid		Fresh y= 20485x 28774 (R ² = 0.9986)	0.80
		Ripened y= 19634x 8830.2 (R ² = 0.9905)	0.77
		Pasta filata y= 17184x - 4816.4 (R ² = 0.9963)	0.67
		Cream y= 20062x +12438 (R ² = 0.9944)	0.79

^a The standard equation and matrix-matched equation curves were built with six concentration levels (including zero) using a linear function of concentration (x) versus peak area (y).

^c Matrix effect was evaluated for each analyte by comparing the slopes of the standard calibration curve with the matrix-matched calibration curve, according to the calculation presented by Hoff et al. (2015).

Natamycin was affected by a considerable suppression signal, caused by different types of cheese and cream. Although less intense, sorbic acid also suffered a considerable matrix effect. Unlike other analytes, nisin suffered a great matrix effect, which contributed to the signal increase (Figure 2). Thus, matrix-matched calibration curves were adopted, being adjusted for each type of cheese and cream.

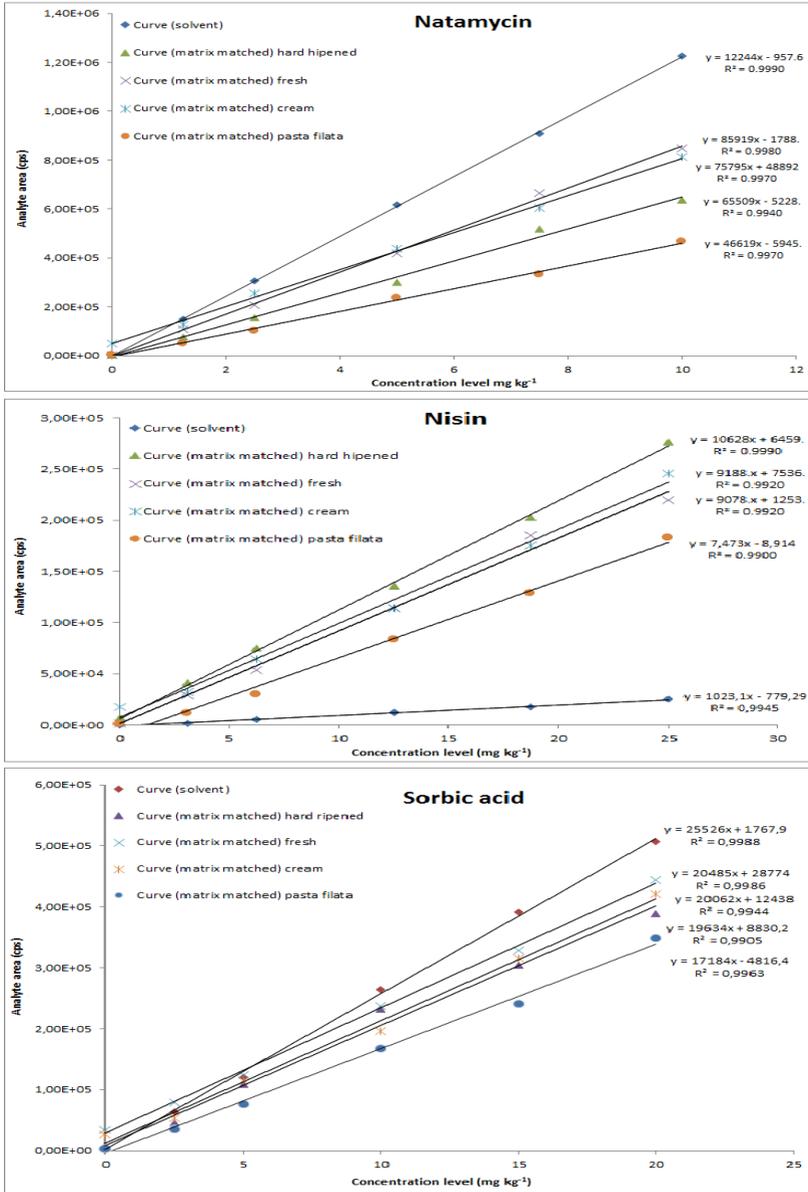


Figure 2. Graphical plot of the calibration curves types used to evaluate matrix effects of different types of cheeses and cream in the determination of preservatives.

3.3.2. Selectivity/specificity

No interference was observed in the analyte retention times for each tested matrix, which was confirmed by comparing fortified blank samples (Figure 3). Thus, matrix endogenous compounds did not affect the developed method.

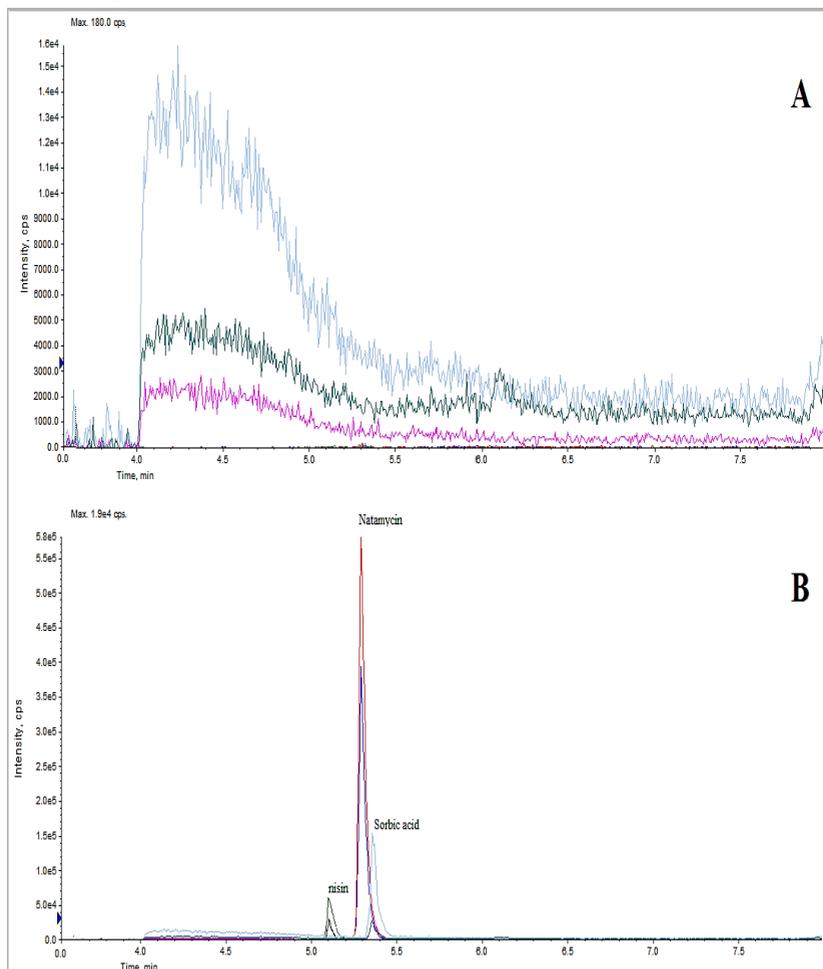


Figure 3 Chromatograms of blank sample (A) and fortified blank sample with nisin, natamycin and sorbic acid (B).

3.3.3. Recovery and precision

The results of accuracy and recovery were satisfactory with CV < 16% and recoveries in the range of -20% to +10% (Table 3). There was no significant difference between the results of accuracy and recovery when analysts and test days were varied ($p > 0.05$).

Table 3. Recovery and precision for the determination of preservatives in cheeses and cream by tandem mass spectrometry-liquid chromatography method.

Preservatives	^a Standard equation		^a Matrix-matched equation	^c Matrix effect
Natamycin	$y = 12244x - 957.6$ ($R^2 = 0.9990$)	Fresh	$y = 85919x - 1788$ ($R^2 = 0.9980$)	0.75
		Ripened	$y = 65609x - 5228$ ($R^2 = 0.9940$)	0.57
		Pasta filata	$y = 46619x - 5945.0$ ($R^2 = 0.9970$)	0.24
		Cream	$y = 75795x + 48892$ ($R^2 = 0.9970$)	0.45
Nisin	$y = 1023.1x - 779.23$ ($R^2 = 0.9945$)	Fresh	$y = 9078.0x + 1253$ ($R^2 = 0.9920$)	8.87
		Ripened	$y = 10628x + 6459$ ($R^2 = 0.9990$)	10.39
		Pasta filata	$y = 7473.0x - 8914$ ($R^2 = 0.9900$)	7.30
		Cream	$y = 9188.0x + 7536$ ($R^2 = 0.9920$)	8.98
Sorbic acid	$y = 25526x + 1767.9$ ($R^2 = 0.9988$)	Fresh	$y = 20485x + 28774$ ($R^2 = 0.9986$)	0.80
		Ripened	$y = 19634x + 8830.2$ ($R^2 = 0.9905$)	0.77
		Pasta filata	$y = 17184x - 4816.4$ ($R^2 = 0.9963$)	0.67
		Cream	$y = 20062x + 12438$ ($R^2 = 0.9944$)	0.79

^a The standard equation and matrix-matched equation curves were built with six concentration levels (including zero) using a linear function of concentration (x) versus peak area (y).

^c Matrix effect was evaluated for each analyte by comparing the slopes of the standard calibration curve with the matrix-matched calibration curve, according to the calculation presented by Hoff et al. (2015).

3.3.4. Ruggedness

According to the criteria of Youden test, the chromatographic method proved to be robust when subjected to small variations. The greatest effects were seen when variations were submitted in the preparation of the samples. Nisin and sorbic acid had considerable effects when the acid concentration in the extraction process was changed. The reduction of the acid concentration confers lower extraction efficiency by changing the solubility of the analytes. However, the greatest effect was observed for nisin, when the freezing time was altered in the sample preparation. It can be inferred that deficiencies in the sample clean-up can lead to signal suppression. Finally, the robustness deviation was surprisingly lower than intermediate precision deviation for all analytes (Table 8). Despite the presented effects, the method can be considered robust.

Table 4. Youden robustness test experimental design.

Selected variables	Nominal condition	Variation	Effect		
			Natamycin (mg kg ⁻¹)	Sorbic acid (mg kg ⁻¹)	Effect Nisin (mg kg ⁻¹)
A/a	0.1% - A	0.08% - a	0.95	0.02	1.13
B/b	0.1% - B	0.08% - b	0.93	3.20	7.26
C/c	60 min - C	50 min - c	0.01	0.88	15.02
D/d	95:5 - D	90:10 - d	0.00	0.74	0.01
E/e	20 min - E	18 min - e	0.35	0.60	3.02
F/f	35°C - F	30°C - f	0.01	0.55	3.12
G/g	90% - G	88% - g	0.19	1.58	0.01
Deviation (robustness):			0.83	2.91	1.47
Deviation (intermediate precision):			9.4	9.8	8.5

(A/a): acid concentration in the mobile phase; (B/b): acid concentration in the extraction; (C/c): extract's freezing time; (D/d): proportion of initial mobile phase to dilute an aliquot of the extract; (E/e): extract's stirring time; (F/f) temperature of chromatographic column and (G/g): concentration of organic solvent in extraction.

3.3.5. Analytical limits

The CC_{α} is the limit from which one can conclude that a sample is non-compliant with a probability of α error and CC_{β} is the lowest content of the substance, which can be quantified in a sample with a probability of β error.¹⁰ These limits should be considered in decision making when non-compliant samples are detected. Violations can occur either by the disrespect to a regulatory level for each preservative, as the detection of unauthorized substances, such as natamycin, nisin and sorbic acid in cream or natamycin in fresh cheeses.

Low limits of detection and quantification were obtained, showing that the developed method has good sensitivity to its purpose.

Table 5. Analytical limits for the determination of preservatives in cheeses and cream by tandem mass spectrometry-liquid chromatography method.

Analyte	Types of cheeses	CC_{α}^*	CC_{β}^*	LOD*	LOQ*
Natamycin	Fresh	2.33	3.41	0.74	1.25
	Hard ripened	5.84	-	0.36	1.25
	Pasta filata	5.54	-	0.32	1.25
	Cream	2.15	3.04	0.90	1.25
Nisin	Fresh	14.49	-	2.90	3.12
	Hard ripened	15.68	-	1.82	3.12
	Pasta filata	14.02	-	2.63	3.12
	Cream	4.85	6.57	0.84	3.12
Sorbic acid	Fresh	11.84	-	0.99	2.50
	Hard ripened	11.68	-	1.58	2.50
	Pasta filata	11.15	-	1.23	2.50
	Cream	3.49	4.47	1.72	2.50

*Values in mg kg^{-1}

3.3.6 Stability test

The stability study demonstrated that, by the fifteenth day, all extracts were stable at any temperature (Figure 4). However, extracts containing natamycin, kept at room temperature until the fifteenth day, presented a significant decrease in the concentration, compared to the freshly prepared one ($p < 0.05$).

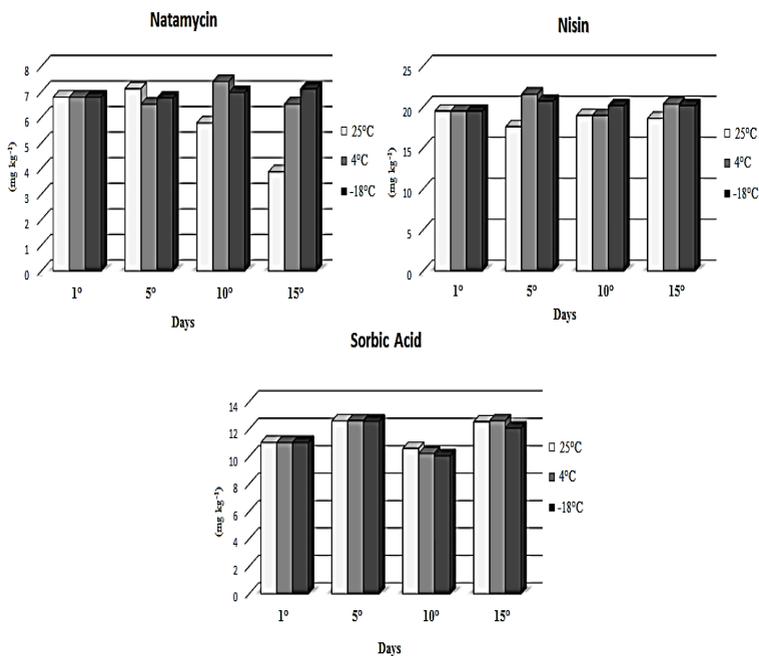


Figure 4. Graphical plot of the extracts stability test for the determination of preservatives in cheese and cream by tandem mass spectrometry-liquid chromatography.

All stock standard solutions remained stable at any temperature until the tenth day. The sorbic acid standards remained stable for all days at any storage temperature. From the sixtieth day, a significant decrease in the concentration of the natamycin solution at room temperature was observed. This behavior was also observed for the nisin solution, whose concentration decreased at all other temperatures. When subjected to room temperature, a decrease in the nisin concentration from the thirtieth day was observed.

From the fifth day on, there was a significant decrease in the concentration of natamycin when subjected to room temperature (Figure 5). The concentration decrease was significant at all temperatures from the thirtieth day on. Nisin solution was not stable from the first day at any storage temperature. The study was conducted with the analyte mix, which did not contain formic acid, unlike the stock solution. Therefore, nisin has greater stability in acid medium. This is corroborated by the study of Delves-Broughton,⁷ who demonstrated that extracts containing acetic acid in its formulation had their concentration maintained until the fifteenth day ($p < 0.05$). On the other hand, sorbic acid remained stable at all temperatures throughout in this study.

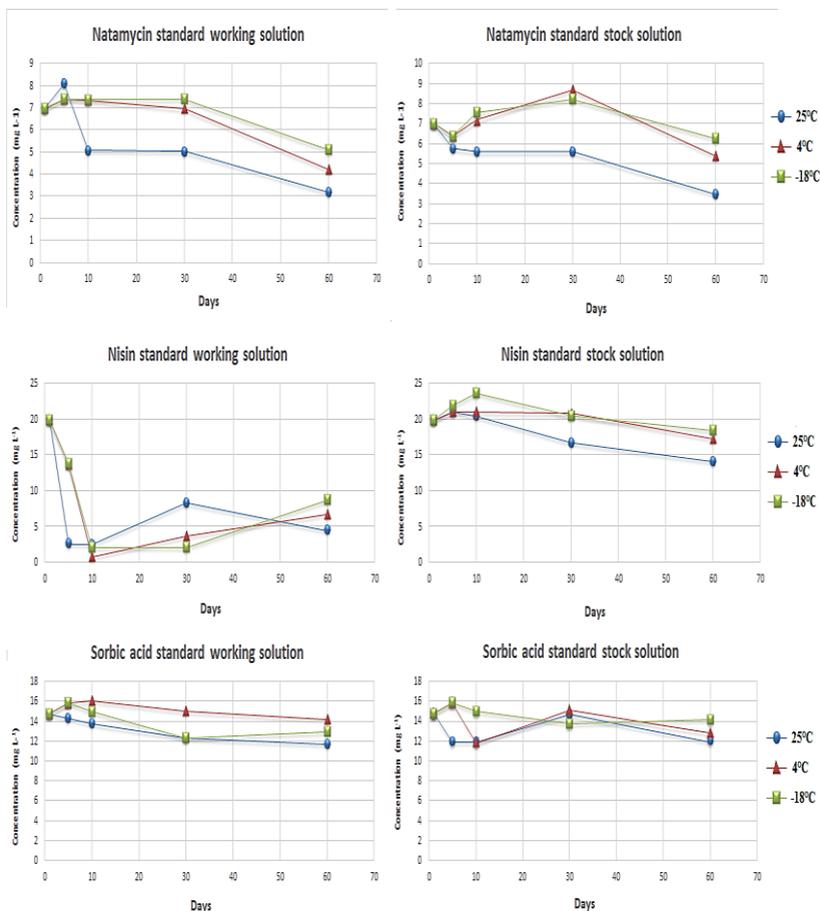


Figure 5. Graphical plot of the standard stability test for the natamycin, nisin and sorbic acid solutions by tandem mass spectrometry-liquid chromatography.

3.4. Real samples analysis

In this work, the method applicability was tested on several commercial types of cheese and cream samples (Table 5). A surprising rate of non-compliance was observed, especially among ripened grated cheeses, indicating that 80% of samples were above the maximum allowed for sorbic acid with an average concentration of $2766.3 \pm 10.8 \text{ mg kg}^{-1}$. Moreover, a major non-compliance for cream samples was observed. In several samples, high concentrations of sorbic acid could

be quantified. This is especially worrying since no preservative is allowed to be added to this matrix by Brazilian regulation. Non-compliance for sorbic acid in fresh cheese was also revealed. Several studies have turned attention to the control of sorbic acid in foods. Tfouni and Toledo, analyzed various foods in Brazil, also detecting non-compliance in some cheese samples.³⁶ In a previous study, we assessed non-compliance for sorbic acid in 71% of *Dulce de Leche* samples ($n = 35$) (data not published yet). The sorbic acid is considered safe for human consumption, with an acceptable daily intake (ADI) of 25 mg per kg^{-1} per body weight.²¹ Our findings show high concentrations of sorbic acid, which demonstrate the need for a stricter control in the processing of cheeses. Despite its low toxicity, cases of idiosyncratic intolerance, as well as hives and allergies, were reported.^{8,15,23,37}

Natamycin has been widely researched in cheeses.^{12,33} In this work, non-compliant results for natamycin in cheese could also be observed. Although natamycin was not detected internally in cheeses, it was found in ripened grated cheeses above the maximum allowed (maximum concentration of $13.0 \pm 2.40 \text{ mg kg}^{-1}$). Paseiro-Cerrato et al. (2013) also reported irregularities in the use of natamycin in cheeses. Natamycin is considered safe for human consumption with an ADI of 0.3 mg kg^{-1} .²² Toxicity studies using natamycin in oral administration in animals warned to avoid its misuse. Natamycin may be related to changes in the immune response and genotoxic effects in rodents.²⁷

Only in a ripened cheese sample, nisin was found above the maximum limit ($18.84 \pm 5.56 \text{ mg kg}^{-1}$). In a study by Fuselli, Guarino, La Mantia, Long, Faberi & Marianella (2012), nisin was also found above the maximum limit in only one type of ripened cheese.¹² In addition to the inadequate practices, the abuse of bacteriocins in food processing can also be related to bacteria resistance mechanisms. Factors such as increased stiffness of the cytoplasmic membrane (associated with mutations of the bacterial DNA) and the enzymatic action of nisinase produced by some bacteria are a major problem in cheese-making. These aspects could justify listeriosis as an opportunistic foodborne infection, tolerant of bacteriocins.^{2,25} Thus, increasing amounts of chemical preservatives have been used.

The main toxicological studies involving bacteriocins refer to tests performed for the approval of nisin in food.¹¹ However, some toxicity studies warned to the misuse of these compounds in the food industry.^{14,32} Bacteriocins can be related to changes in the immune response and genotoxic effects. Nisin was able to modulate the immune response of rodents, increasing the amount of T lymphocytes (CD4 and

CD8) and also increasing the number of macrophages and monocytes in the peripheral circulation.³²

3.5. Measurement uncertainty (MU)

Table 5. Quantification of preservatives in commercial cheeses and cream samples by tandem mass spectrometry-liquid chromatography.

Samples	Preservatives content (mg kg ⁻¹ ± MU ^a)			
	Natamycin (surface)	Natamycin (internal)	Nisin	Sorbic acid
Ripened (cut and sliced) (n= 10)				
Min. concentration	0.37 ± 0.11	< LOD	2.53 ± 1.06	1.78 ± 0.57
Max. concentration	1.42 ± 0.45	< LOD	13.28 ± 5.56	28.69 ± 3.26
Average	0.66 ± 0.21	< LOD	7.91 ± 3.32	14.65 ± 3.15
Ripened (grated) (n= 10)				
Min. concentration	-	0.74 ± 0.23	< LOD	854.43 ± 6.43
Max. concentration	-	13.00 ± 2.40	< LOD	5714.88 ± 11.77
Average	-	6.22 ± 1.61	< LOD	2766.31 ± 10.8
Fresh (n= 50)				
Min. concentration	-	< LOD	< LOD	0.99 ± 0.32
Max. concentration	-	< LOD	< LOD	2726.75 ± 10.7
Average	-	< LOD	< LOD	519.73 ± 6.41
Pasta filata (n= 18)				
Min. concentration	-	1.25 ± 0.40	< LOD	4.03 ± 1.30
Max. concentration	-	4.05 ± 1.58	< LOD	5.56 ± 1.80
Average	-	1.41 ± 0.45	< LOD	4.79 ± 1.55
Cream (n= 12)				
Min. concentration	-	< LOD	< LOD	6.24 ± 2.02
Max. concentration	-	< LOD	< LOD	616.23 ± 6.42
Average	-	< LOD	< LOD	278.34 ± 4.16

The measurement uncertainty provides analysts detailed knowledge of the method and more reliable measures.⁹ Moreover, MU provides measures a dispersion at any level of concentration. In this study, the method presented in ISO GUIDE 1995 was successfully adapted to calculate the measurement uncertainty. As it can be seen in Table 7, the greatest contribution of uncertainties was the intra-day and inter-day precision (variability). Uncertainty values obtained were around 30% compared to CC_α values of 15%. The MU values were higher than the CC_α values, due to the contribution of random effects, to “type B” uncertainties as calibration certificates, and to errors and resolutions inherited from equipments and uncertainties calibration curves.¹⁹

Table 7. Standard uncertainty values in the determination of preservatives in cheeses and cream by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Nisin												
^a Type	Measurement variable	Quantity value	Uncertainty value	Divisor	^b u(x _i)	Entrance Unity	Distribution	^c C _i	^d u(y _i)	Output unity	^e V _{eff}	Contribution
B	weight u(m)	2.1000	0.0010	2.02	0.0005	g	t-Student	-28.36	0.0140	mg kg ⁻¹	∞	0.40%
B	volume u(V)	10.00	0.0013	2.02	0.00	ml	t-Student	5.96	0.0038	mg kg ⁻¹	∞	0.11%
A	calibration curve u(L)	12.46	0.6904	2.23	0.31	mg kg ⁻¹	t-Student	4.76	1.4742	mg kg ⁻¹	12.09	41.88%
A	variability u(R&R)	13.30	2.0308	1.00	2.03	-	t-Student	1.00	2.0308	-	17.00	57.69%
					combined uncertainty (u _c) = expanded uncertainty (U) =		2.51		V _{eff} =	28.51		
					coverage factor (K) =		5.24					
					coverage factor (K) =		2.09					
Natamycin												
^a Type	Measurement variable	Quantity value	Uncertainty value	Divisor	^b u(x _i)	Entrance Unity	Distribution	^c C _i	^d u(y _i)	Output unity	^e V _{eff}	Contribution
B	weight u(m)	2.1000	0.0010	2.02	0.0005	g	t-Student	-11.38	0.0056	mg kg ⁻¹	∞	0.62%
B	volume u(V)	10.00	0.0013	2.02	0.00	ml	t-Student	2.39	0.0015	mg kg ⁻¹	∞	0.17%
A	calibration curve u(L)	5.02	0.0799	2.23	0.04	mg kg ⁻¹	t-Student	4.76	0.1707	mg kg ⁻¹	12.09	18.97%
A	variability u(R&R)	5.03	0.7222	1.00	0.72	-	t-Student	1.00	0.7222	-	17.00	80.24%
					combined uncertainty (u _c) = expanded uncertainty (U) =		0.74		V _{eff} =	18.87		
					coverage factor (K) =		1.60					
					coverage factor (K) =		2.15					

Sorbic acid												
^a Type	Measurement variable	Quantity value	Uncertainty value	Divisor	^b u(x _i)	Entrance Unity	Distribution	^c C _i	^d u(y _i)	Output unity	^e V _{eff}	Contribution
B	weight u(m)	2.1000	0.0010	2.02	0.0005	g	t-Student	-22.71	0.0112	mg kg ⁻¹	∞	0.57%
B	volume u(V)	10.00	0.0013	2.02	0.00	ml	t-Student	4.77	0.0030	mg kg ⁻¹	∞	0.17%
A	calibration curve u(L)	10.02	0.2490	2.23	0.11	mg kg ⁻¹	t-Student	4.76	0.5316	mg kg ⁻¹	12.09	18.97%
A	variability u(R&R)	10.54	1.4302	1.00	1.43	-	t-Student	1.00	1.4302	-	17.00	72.23%
						combined uncertainty (u _c) =	1.53		V _{eff} =		21.45	
						expanded uncertainty (U) =	3.25					
						coverage factor (K) =	2.13					

^a Type A - Method of evaluation of uncertainty by the statistical analysis of series of observations. Type B - Method of evaluation of uncertainty by means other than the statistical analysis of series of observations.; ^b u(x_i) entrance standard uncertainty; ^c C_i-Sensitivity coefficient; ^d u(y_i) output standard uncertainty; ^e V_{eff}= effective degrees of freedom.

4. Conclusions

The method developed in this work has simplified extraction and short time of chromatographic analysis (about eight minutes) for the simultaneous determination of natamycin, nisin and sorbic acid in different types of cheese and cream. All validation parameters met the recommendations of the Directive 2002/657/EC. The method was tested on several commercial samples, demonstrating its applicability. The occurrence of non-compliance in 17.3% of the samples and the detection of forbidden preservatives in cream demonstrate the importance of controlling the use of preservatives in dairy products. Thus, the proposed method can be an efficient tool for the inspection of natamycin, nisin and sorbic acid in cheeses and cream.

5. References

- (1) Aparicio, F.; Fouces, R.; Mendes, V.; Olivera, N.; Martín, F. A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimarinin in *Streptomyces natalensis*. *Chem. & biology*. 2000, 11, 895-905.
- (2) Begley, M.; Hill, C.; Gahan, G. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and environmental microb.* 2006. 72, 1729-1738.
- (3) Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); Guia de Validação e Controle da Qualidade Analítica: *Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários, Secretaria de Defesa Agropecuária*. MAPA/ACS. Brasília, 2011.
- (4) Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 7 de março de 1996. Regulamento Técnico e Qualidade de Produtos Lácteos. Diário Oficial da União, Brasília, 1996 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- (5) Bretanha, C.; Piovezan, M.; Sako, V.; Pizzolati, G.; Micke, A. Strategy for a fast and simple method for trace determination of senecionine and senecionine n-oxide in honey using large volume

injection in HPLC-MS/MS. *American J. of Anal. Chem.* 2014, 2014, 681-687.

(6) Cotter, D.; Hill, C.; Ross, P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microb.* 2005, 10, 777-788.

(7) Delves-Broughton, J. Nisin as a food preservative. *Food. Aus.* 2005, 57, 525-527.

(8) Deuel, J.; Calbert, E.; Anisfeld, L.; Mckeehan, H.; Blunden, D. Sorbic acid as fungistatic agent for foods. II Metabolism of b-unsaturated fatty acids with emphasis on sorbic acid. *Food Research.* 1954, 6, 13-19.

(9) Ellison, R.; Rosslein, M.; Williams, A. Quantifying uncertainty in analytical measurement, 2nd ed.; ISBN Eurachem/Citac Guide CG 4; 2000.

(10) European Commission (EC). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. Off. J. of the Eur. Communities, Brussels, L221/8, 2002.

(11) FDA. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. Fed. Register. 1988, 54, 11247-11251.

(12) Fuselli, F.; Guarino, C.; La Mantia, A.; Longo, L.; Faberi, A.; Marianella, M. Multi-detection of preservatives in cheeses by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. of Chromatography B.* 2012, 906, 9-18.

(13) Guarino, C.; Fuselli, F.; La Mantia, A.; Longo, L. Development of an RP-HPLC method for the simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, natamycin and lysozyme in hard and pasta filata cheeses. 2011, *Food chem.* 2011, 127, 1294-1299.

(14) Hagiwara, A.; Imai, N.; Nakashima, H.; Toda, Y.; Kawabe, M.; Furukawa, F.; Hayashi, M. (2010). A 90-day oral toxicity study of nisin A, an anti-microbial peptide derived from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, in F344 rats. *Food and Chem. Toxicology.* 2010, 48, 2421-2428.

(15) Hannuksela, M.; Haahtela, T. Hypersensitivity reactions to food additives. *Allergy*. 1987, 42, 561-575.

(16) Hoff, B.; Rubensam, G.; Jank, L.; Barreto, F.; Peralba, R.; Pizzolato, M.; Díaz-Cruz, S.; Barceló, D. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: Matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. *Talanta*. 2014, 135, 443-450.

(17) ISO 9231:2008. Milk and milk products- Determination of benzoic and sorbic acid contents. Method by high-performance liquid chromatography on a reversed-phase. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization. IDF 139, ISO (2008).

(18) ISO 9233:2008. Cheese rind and processed cheese. Determination of natamycin content. Method by molecular Absorption Spectrometry and by high-performance liquid chromatography. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization. IDF 140, ISO (2007).

(19) ISO Guide 98:1995, Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 1995, ISBN 92-67, 10188-9.

(20) ISO/TS 27106:2009 . Cheese- Determination of nisin A content by LC-MS and LC-MS-MS. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization. IDF/RM 217, ISO (2009).

(21) JECFA, 2002a. Evaluation of certain food additives. Fifty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (70th meeting). Roma, Italy.

(22) JECFA, 2002b. Natamycin. Evaluation of certain food additives. Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, (57th meeting). WHO Food Additives Series 48, pp. 49-76, 2015.

(23) Juhlin, L. Recurrent urticaria: clinical investigation of 330 patients. *British J. of Dermatology*. 1981, 104, 369-381.

(24) Kallinteri, L. D., Kostoula, O. K., & Savva, I. N. (2013). Efficacy of nisin and/or natamycin to improve the shelf-life of Galotyri cheese. *Food microbiology*, 36(2), 176-181.

(25) KIM, J. Bacteriocins of lactic acid bacteria: their potentials as food biopreservative. *Food Reviews Int.* 1993, 9, 299-313.

(26) Ko, Kyung Yuk et al. Analysis method for determination of nisin A and nisin Z in cow milk by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. of Dairy Sci.*, 2015.

(27) Martínez, A.; Martínez-Larrañaga, R.; Castellano, V.; Martínez, M.; Ares, I.; Romero, A.; Anadón, A. Effect of natamycin on cytochrome P450 enzymes in rats. *Food and Chem. Toxicology.* 2013, 62, 281-284.

(28) McLauchlin, J.; Mitchell, T.; Smerdon, J.; Jewell, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. j. of food microb.* 2004, 92, 15-33.

(29) Moraes, F.; Gouveia, R.; Soares, F.; Santos, S.; Gonçalves, C. Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano na conservação de manteiga. *Ciência e Tecnol. de Alimentos.* 2007, 27, 33-36.

(30) NBR ISO/IEC 17025:2005. Associação Brasileira de Normas Técnicas. *Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração*, Brasil, Rio de Janeiro, setembro de 2005.

(31) Ohtsuki, T.; Sato, K.; Sugimoto, N.; Akiyama, H.; Kawamura, Y. Absolute quantitative analysis for sorbic acid in processed foods using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Chim. Acta.* 2012, 734, 54-61.

(32) Pablo, A.; Gaforio, J.; Gallego, M.; Ortega, E.; Gálvez, M.; Alvarez, G. Evaluation of immunomodulatory effects of nisin-containing diets on mice. *FEMS Immunology & Medical Microb.* 1999, 24, 35-42.

(33) Paseiro-Cerrato, R., Otero-Pazos, P., de Quirós, A. R. B., Sendón, R., Angulo, I., & Paseiro-Losada, P. (2013). Rapid method to determine natamycin by HPLC-DAD in food samples for compliance with EU food legislation. *Food Control*, 33(1), 262-267.

(34) Schneider, N.; Werkmeister, K.; Pischetsrieder, M. Analysis of nisin Z and their degradation products by LCMS/MS. *Food Chem.* 2011, 127, 847-854.

(35) Soliman, C.; Donkor, K. Method development for sensitive determination of nisin in food products by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chem.*, 2010, 119, 801-805.

(36) Tfouni, V.; Toledo, F. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. *Food control.* 2002, 13, 117-123.

(37) Walker, R. Toxicology of sorbic acid and sorbates. *Food Additives & Contaminants.* 1990, 7, 671-676.

(38) Youden, J.; Steiner, H. Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists; statistical techniques for collaborative tests, planning and analysis of results of collaborative tests. *In Statistical manual of the Association of Off.l Anal. Chem.; statistical techniques for collaborative tests, planning and analysis of results of collaborative tests.* 1975, AOAC.

(39) Zamani, F.; Esmaeili, F.; Moradi-Khatoonabadi, Z.; Shaneshin, M.; Torabi, P.; Shams, R.; Hajimahmoodi, M. Sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in Iranian doogh. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2014, 7, 115-119.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo revelou um alto índice de amostras não conformes quanto à utilização de conservantes antimicrobianos. No total de 135 amostras analisadas, incluindo diversos tipos de queijos, creme de leite, requeijão, doce de leite e sobremesas lácteas, 42 amostras apresentaram alguma concentração de conservante acima do permitido, isto é, 30% das amostras estavam não conformes. No total das amostras, 36 amostras apresentaram concentração de ácido sórbico acima dos limites máximos permitidos pela legislação brasileira, inclusive em amostras de creme de leite, cuja legislação não permite a adição de qualquer tipo de conservante. A não conformidade quanto ao uso da natamicina também foi verificada. Em quatro amostras, foi detectada natamicina em zonas proibidas e com violação à concentração máxima preconizada pela legislação. Em alguns casos foram constatados valores até quatro vezes acima do permitido. Já a nisina, apesar de poucas amostras não conformes, também foram verificados valores acima do permitido em amostras de queijos curados. Muitas das amostras violadas não apresentavam o conservante declarado no rótulo, o que torna a situação ainda mais grave, já que não oferece a opção ao consumidor que não deseja incluir o conservante em sua dieta. Outro ponto agravante, foi a constatação que de todos os laticínios investigados que apresentaram algum tipo de produto não conforme, apresentaram não conformidades em todos os outros produtos investigados. Contudo, entende-se que essa prática é aplicada em diversas linhas de processamento de alimentos e, provavelmente, em outros produtos não investigados. Considerando os resultados obtidos, pode-se sugerir que mais pesquisas sejam realizadas, com o desenvolvimento de métodos analíticos rápidos (simultâneos), sensíveis e com confiabilidade para a determinação de conservantes antimicrobianos em outras matrizes. Com o surgimento de mais métodos visando à conformidade, a fiscalização desses alimentos pode ser ainda mais efetiva e conseqüentemente proporcionar mais segurança alimentar para os consumidores.