

XXV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 5 de março de 2020

Determinação dos parâmetros de fragmentação da Ivermectina para sua identificação por espectrometria de massas

Jaqueline Almeida², Michelle Loures³, Juliana Gern⁴, Danielle Cinelli⁵, Geovana Onorato⁶, Isabella Bitencourt⁷, Humberto M. Brandão⁸

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil: (a) Parte do projeto “Desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de cloxacilina nanoestruturada em plasma bovino usando cromatografia líquida acoplada a um sistema tandem de espectrometria de massas”, liderado por Jaqueline de Almeida Celestino.

²Graduanda em Química – UFJF. e-mail: jaqueline@ice.ufjf.br

³Analista, Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora/MG.e-mail: michelle.loures@embrapa.br

⁴Pesquisadora, Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora/MG.e-mail: juliana.gern@embrapa.br

⁵Graduada em Medicina Veterinária – UFJF

⁶Pós Graduanda em Ciências Biológicas – UFJF

⁷Graduanda em Medicina Veterinária – UFJF

⁸Orientador

Resumo: A Ivermectina é um antiparasitário pertencente ao grupo das lactonas macrocíclicas, constituída por dois homólogos, sendo esses denominados B1a que representa 80% e B1b 20%. No Brasil, a Ivermectina é um fármaco amplamente utilizado na bovinocultura, contudo seu uso pode gerar resíduos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar os parâmetros de fragmentação e ionização do medicamento no espectrômetro de massas afim de, posteriormente, usá-los em desenvolvimento de método quantitativo de análise por LC-MS/MS. Para a otimização dos parâmetros preparou-se duas soluções de concentrações distintas e fez-se a infusão no equipamento, de acordo com o sinal dos picos nos espectros obtidos verificou-se a solução que obteve-se um sinal de melhor qualidade. Após a escolha da concentração ideal para infusão, determinou-se as melhores condições analíticas para a fragmentação e ionização da molécula de Ivermectina. Com o sinal intenso e estável, identificou-se o íon precursor da molécula e dois íons provenientes da sua fragmentação. Sendo possível afirmar, devido a razão m/z apresentada no espectro que a molécula refere-se ao homólogo B1a. Portanto, com o presente trabalho determinou-se os parâmetros analíticos mais eficientes de fragmentação no espectrômetro de massas para a Ivermectina e a partir deles constatou-se a presença do homólogo B1a e seus principais fragmentos, conforme descrito na literatura.

Palavras-chave: espectrômetro de massas, homólogo, ivermectina, parâmetros

Determination of Ivermectin fragmentation parameters for its identification by mass spectrometry

Abstract: Ivermectin is an antiparasitic belonging to the group of macrocyclic lactones, consisting of two homologues, these being called B1a which represents 80% and B1b 20%. In Brazil, Ivermectin is a drug widely used in cattle farming, however its use can generate waste. Therefore, the objective of this work was to optimize the fragmentation and ionization parameters of the drug in the mass spectrometer in order to subsequently use them in the development of a quantitative method of analysis by LC-MS / MS. For the optimization of the parameters, two solutions of different concentrations were prepared and the equipment was infused, according to the signal of the peaks in the obtained spectra, the solution that obtained a better quality signal was verified. After choosing the ideal concentration for infusion, the best analytical conditions for the fragmentation and ionization of the Ivermectin molecule were determined. With the strong and stable signal, the precursor ion of the molecule and two ions from its fragmentation were

XXV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG – 5 de março de 2020

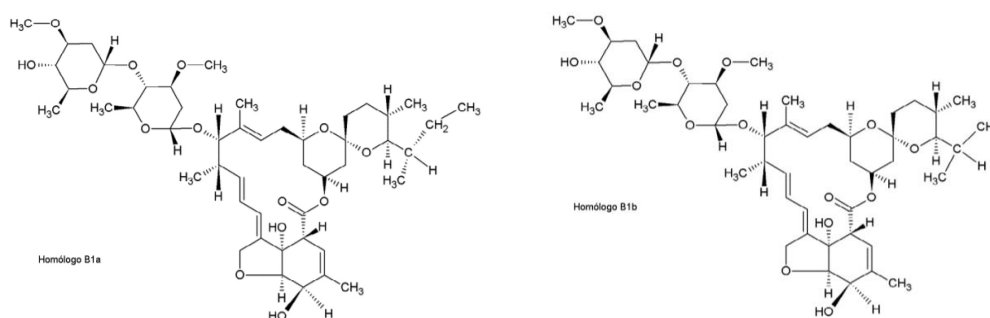
identified. It is possible to state, due to the m/z ratio presented in the spectrum, that the molecule refers to the homologue B1a. Therefore, with the present work it was determined the most efficient analytical parameters of fragmentation in the mass spectrometer for Ivermectin and from them the presence of the homologue B1a and its main fragments was verified, as described in the literature.

Keywords: mass spectrometer, homolog, ivermectin, parameters

Introdução

A Ivermectina é um antiparasitário que pertence ao grupo das Avermectinas, sendo essas, lactonas macrocíclicas produzidas pela fermentação do fungo *Streptomyces avermitilis* presentar. A Ivermectina consiste em uma mistura de homólogos, como representado na Figura 1, na proporção 8:2, chamados B1a (5-O-dimetil-22,23-di-hidroavermectina_{A1a}), que tem fórmula molecular $C_{48}H_{74}O_{14}$ e massa molecular de 875.1 g/mol, enquanto que o homólogo minoritário B1b(5-O-dimetil-25-(1-metilpropil)-22,23-di-hidro-25-(1-metil-etil)avermectina_{A1a}) apresenta fórmula molecular $C_{47}H_{72}O_{14}$ e massa molecular 861.07 g/mol (Da Costa & Perreira Netto, 2012).

Figura 1: Estrutura química dos homólogos que compõem a Ivermectina (Fonte: Da Costa & Perreira Netto, 2012).



Com o intensivo avanço da agropecuária no Brasil, os antiparasitários vêm impulsionando a venda de fármacos das indústrias veterinárias na bovinocultura, sendo a Ivermectina um destaque devido a eficácia deste medicamento no tratamento contra um grande espectro de endo e ectoparasitos (Ballweber & Baeten, 2012).

Contudo, seu uso pode gerar resíduos que interferem na exportação de produtos de origem animal e na segurança do consumidor. Dessa forma, desenvolver métodos analíticos que possam ser utilizados tanto para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas mais eficientes quanto para o controle de resíduos é extremamente importante para a sociedade (da Costa & Perreira Netto, 2012).

Assim, dentro deste contexto, a espectrometria de massas é uma técnica padrão e amplamente empregada tanto para identificar resíduos de fármacos, quanto para determinar condições farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Visando propor um método analítico para determinação de Ivermectina em plasma bovino, a primeira etapa consiste na determinação de melhores condições de ionização e fragmentação da molécula alvo.

XXV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 5 de março de 2020

Portanto, o objetivo do presente trabalho é buscar e definir os parâmetros de injeção, ionização e fragmentação para a identificação da Ivermectina, precedendo o desenvolvimento de um método cromatográfico.

Material e Métodos

Reagentes: Os reagentes utilizados para o experimento foram acetonitrila grau HPLC- PA (J.T. Baker, EUA); ácido fórmico $\geq 98\%$ (Sigma, EUA); IVOME[®] injetável (solução de Ivermectina 1% p/v).

Preparo de solução: Utilizando-se o fármaco IVOME[®] injetável e acetonitrila preparou-se uma solução de concentração 100 ppm (solução estoque). A solução estoque foi diluída com acetonitrila até a obtenção de soluções finais de concentração 1ppm e 300 ppb. Uma alíquota de 1,5 mL da solução 1ppm foi acidificada com 5 μ L de ácido fórmico.

Espectrômetro de Massa (MS) - Triplo Quadrupolo: O detector utilizado nas análises foi o MS XEVO-TQS (modelo WAA907 – Waters, Inglaterra) equipado com fonte de ionização ESI e analisador de massa do tipo triplo quadrupolo. O gás de dessolvatação utilizado pelo equipamento foi o nitrogênio (N₂) e o gás de fragmentação usado foi o argônio. Os parâmetros analíticos (potencial capilar (kV), potencial cone (V), temperatura capilar (°C), temperatura dessolvatação (°C), fluxo gás no cone (L/Hr), fluxo gás de solvatação (L/Hr) e energia de colisão (V)) foram alterados no experimento, na busca da melhor condição para a identificação do íon precursor e do íons fragmentados.

Identificação da Ivermectina: Iniciou-se o experimento com a infusão das soluções preparadas, logo após, com a otimização dos parâmetros foi realizada a fragmentação da molécula para várias energias de colisão (10 a 50 V).

Resultados e Discussão

Para a otimização dos parâmetros analíticos da Ivermectina utilizou-se a infusão direta da solução de Ivermectina acidificada de concentração 1 ppm, a qual intensificou o sinal base da Ivermectina e de seus fragmentos quando comparada com a solução neutra.

O íon precursor da Ivermectina foi identificado como um aduto de sódio $[M+Na]^+$ com 897,4 m/z (Figura 2), podendo-se admitir que trata-se do homólogo B1a. Pois a massa encontrada é equivalente a soma da massa do homólogo B1a que consiste em 875,1 g/mol com a massa de um sódio que é aproximadamente 22,9 g/mol, conforme o apontado por Croubels e colaboradores (2002). Uma vez identificado o íon precursor, realizaram-se testes de otimização dos parâmetros analíticos do equipamento para definir a melhor condição de análise para a Ivermectina, os quais apresentam-se na Tabela 1. Uma vez definida a melhor condição de ionização deu-se o início à padronização do processo de fragmentação para confirmação da molécula mãe. Para tanto, foram utilizadas energias de colisão variando entre 10 e 50 V, buscado assim obter um espectro de fragmentação com perfil semelhante ao encontrado na literatura, também houve a variação dos demais parâmetros.

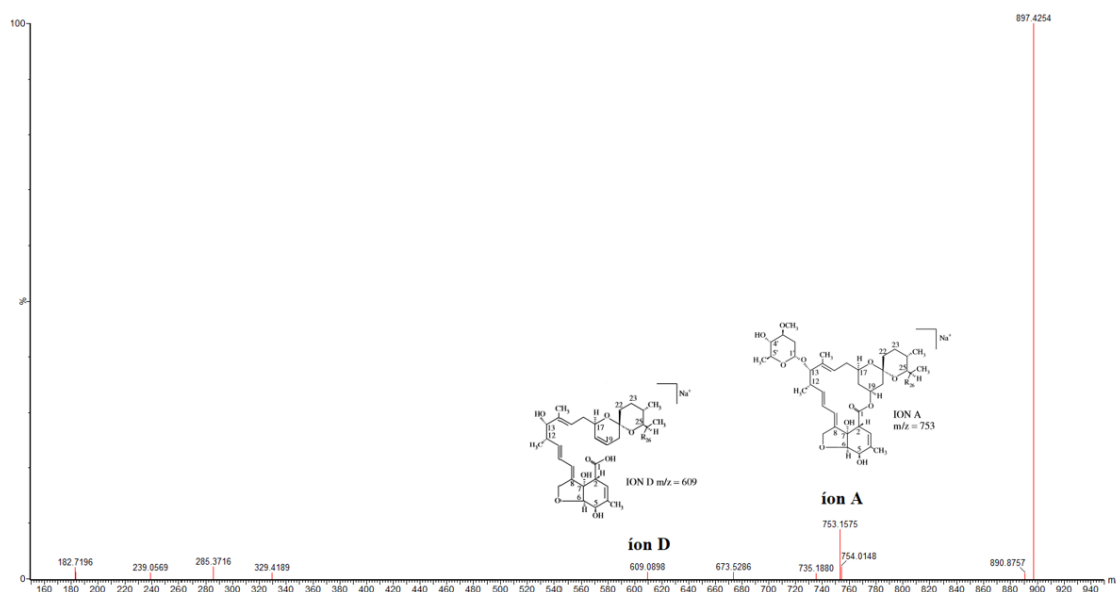
Em uma tensão de cone de 50 V e uma energia de colisão de 40 V foram encontradas como as melhores condições de fragmentação, gerando os íons filhos A e D, os quais devido à perda de um ou dois resíduos de monossacarídeos, respectivamente, correspondendo ao íon A $[M-144+Na]^+$ em 753,3 m/z e o íon D $[M-2x144+Na]^+$ em 609,4 m/z, conforme relatos prévios de Croubels et al (2002).

XXV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG – 5 de março de 2020

Tabela 1: Parâmetros analíticos do espectrômetro de massa otimizados para identificação de Ivermectina.

Parâmetros	ESI +
Potencial Capilar (kV)	3,70
Potencial Cone (V)	50
Temperatura Capilar (°C)	150
Temperatura Dessolvatação (°C)	300
Fluxo gás no cone (L/Hr)	40
Fluxo gás dessolvatação (L/Hr)	500
Energia de colisão (V)	40

Figura 2: Espectro de fragmentação do homólogo B1a da Ivermectina.



Conclusões

Com o presente trabalho obteve-se os melhores parâmetros de ionização e fragmentação para a molécula de Ivermectina no MS, sendo possível a identificação do íon precursor do homólogo B1a e alguns de seus fragmentos. Baseado nestes resultados, poderá ser desenvolvido um método analítico cromatográfico acoplado a espectrometria de massas para quantificação da Ivermectina por espectrometria de massas.

XXV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG – 5 de março de 2020

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Humberto Brandão e a analista Michelle D.A Loures pelos ensinamentos e ajuda prestada, aos órgãos de fomento CNPq, FAPEMIG, Rede Agronano e a Embrapa Gado de Leite.

Referências

BALLWEBER, L. R.; BAETEN, L.A. Use of macrocyclic lactones in cattle in the USA. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, p. 1061-1069, 2012.

CROUBELS, S.; DE BAERE, S.; CHERLET, M.; DE BAKER, P. Determination of ivermectin B1a in animal plasma by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 37, p. 840-847, 2002. DOI: 10.1002/jms.343.

DA COSTA, F.M.; PEREIRA NETTO, A.D. Desenvolvimento e aplicação de métodos para determinação de Ivermectina em medicamentos de uso veterinário. **Química Nova**, v.35, p.616-622, 2012. DOI: 10.1590/S0100-40422012000300031.