

Os Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ) definidos em procedimentos de validação intralaboratorial, bem como os Limites Aceitáveis (LA) de CMP, são estabelecidos pelo DIPA.

## 2. Fundamentos

A configuração de marcha analítica adotada envolve uma primeira etapa de separação dos picos por cromatografia líquida de exclusão molecular (SEC), que permite uma análise de triagem com aplicações semiquantitativas, seguida da coleta das frações de interesse para as amostras consideradas positivas, purificação e digestão triptica dos compostos isolados e análise discriminatória e quantitativa por eletroforese capilar (EC). A prova definitiva da estrutura molecular dos compostos será realizada pelas técnicas de digestão triptica e caracterização dos fragmentos característicos de cada composto por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Ressalta-se que a etapa de EC pode ser suprimida, sendo, neste caso, as amostras positivas na triagem confirmadas diretamente por LC-MS/MS.

### 2.1. Composição do lote

Para cada lote de análise, deve-se preparar uma curva de calibração de, no mínimo, três pontos (triagem por SEC) ou de, no mínimo, cinco pontos (quantificação, EC ou LC-MS/MS). Amostras de CMP dissolvido em solvente (ver item 6.2.2) são analisadas em duplicata (no mínimo), para cálculo da recuperação. As amostras desconhecidas são analisadas em uma única alíquota por SEC. Amostras positivas devem ter suas identidades confirmadas e serem quantificadas com, no mínimo, três replicatas pelos métodos de EC e LC-MS/MS. Cada lote também deve ser acompanhado de uma amostra branca.

### 3. Reagentes, padrões e materiais

Todas as substâncias químicas e solventes utilizados são de grau analítico exceto onde está especificado. Água deionizada ou duplamente deionizada deve ser usada durante todo o trabalho.

#### Método de triagem (SEC)

- . Ácido fosfórico
- . Ácido tricloroacético (TCA)
- . Cloreto de sódio
- . Dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- . Hidrogenofosfato de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )
- . Hidróxido de potássio p.a.

- . Leite cru (preferencialmente recém-ordenhado)
- . Sulfato de sódio anidro
- . Padrão de CMP (Davisco Foods ou similar)
- Método de quantificação (EC)
- . Fluorescamina
- . Tetraborato de sódio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )
- . Ácido bórico
- . Acetona
- .  $\beta$ -Ciclodextrina
- . Hidróxido de sódio
- . Tripsina de pâncreas suíno (CAS 9002-07-7) com aproximadamente  $1500\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$
- . Bicarbonato de amônio
- Método de quantificação e/ou confirmação (LC-MS/MS)
- . Acetonitrila
- . Ácido acético glacial
- . Ácido trifluoroacético
- 4. Equipamentos
- Método de triagem (SEC)
- . Barras magnéticas de 2,5-3,0 cm aproximadamente
- . Bureta (preferencialmente, de 50 mL)
- . Copo de béquer de vidro ou plástico (ou frasco similar) de 50, 100 ou 150 mL (para amostras)
- . Frascos de injetor automático com volume de 1,5-2,0 mL
- . Funil de vidro
- . Papel de filtro qualitativo Whatman nº 4 ou nº 5 ou similar
- . Suporte para funis
- . Agitador magnético com aquecimento
- . Centrífuga refrigerada
- . Homogeneizador tipo vórtex
- . Pipetas de Pasteur descartáveis
- Método de quantificação (EC)
- . Copo de béquer de vidro ou plástico (ou frasco similar) de 50, 100 ou 150 mL (para amostras)
- . Microtubos tipo Eppendorf ou similar, volumes de 1,5 ou 2,0 mL
- . Vidraria comum de laboratório para preparo de soluções
- . Micropipeta para faixa de volume de 100-1000  $\mu\text{L}$
- . Unidades filtrantes descartáveis com filtros de 0,22 ou 0,45  $\mu\text{m}$  para soluções aquosas tipo Millipore ou similar
- . Banho de gelo
- Método de quantificação e/ou confirmação (LC-MS/MS)
- . Frascos de injetor automático com volume de 1,5 ou 2,0 mL
- . Micropipeta para faixa de volume de 100-1000  $\mu\text{L}$

### 5. Precauções analíticas

Este método envolve o uso de substâncias químicas nocivas e procedimentos que apresentam risco ao operador. Roupas de proteção, incluindo jaleco (abotoado e de mangas longas), óculos e luvas de segurança devem ser utilizados durante todo o processo. Solventes orgânicos somente podem ser manipulados em ambientes com exaustão adequada. Amostras de alimentos em geral devem ser considerados de risco biológico, evitando-se o contato direto com a pele e mucosas.

#### 6. Procedimentos

6.1. Preparo de Soluções  
6.1.1. TCA 24%  
Pesar 120 g de TCA e diluir com água d/d para um volume de 500 mL. Esta solução deve ser preparada nova para cada lote de análises.

6.1.2. Solução-padrão estoque de CMP ( $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )  
Pesar 0,05 g de CMP e diluir em balão de 50 mL com tampão borato 20mM pH 10 (diluir o padrão com 25 mL de tampão borato 40mM e levar a volume de 50 mL com água). Esta solução deve ser mantida refrigerada até o momento de uso, sendo estável por 1 mês nestas condições. Para uso imediato, o solvente pode ser água d/d. Concentração final da solução:  $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Considerando pureza de 97% e peso molecular de  $\pm 6700\text{ Da}$ , a molaridade desta solução é de aproximadamente  $72,5\text{ }\mu\text{M}$  de CMP.

6.1.3. Solução da fase móvel tampão pH 6,0 para SEC  
Dissolver 1,74g de hidrogenofosfato de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 12,37g de dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e 21,41 g de sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) em aproximadamente 700 mL de água; ajustar o pH da solução em 6,0, usando solução de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 1M ou solução de hidróxido de potássio (KOH) a 50 % (m/v). Completar o volume para 1000mL com água, filtrar a solução em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ .

6.1.4. Solução de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 1M  
Transferir 2 mL de ácido fosfórico concentrado para balão volumétrico de 100 mL contendo 50 mL de água. Esfriar e completar o volume.

6.1.5. Solução de hidróxido de potássio (KOH) a 50 % (m/v)  
Dissolver 50 g de hidróxido de potássio com 50 mL de água.

6.1.6. Solução de bicarbonato de amônio 50 mM  
Dissolver 0,79 g de bicarbonato de amônio em 200 mL de água d/d.

6.1.7. Solução-estoque de tripsina ( $200\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )  
Dissolver 20 mg de tripsina em 100 mL de ácido acético 50 mM. Esta solução é estável até 1 mês sob refrigeração. Diluir 10 vezes para o uso com a solução de bicarbonato de amônio 50 mM. Fazer as diluições sempre em banho de gelo.

Por exemplo, para solução com 1 mg de CMP por mL, usar 1 mL de solução diluída de tripsina para obter uma razão enzima:substrato de 1:50. Para as análises em LC-MS/MS, o produto de digestão pode ser diluído até 1000 vezes, dependendo da concentração prevista pelo método de triagem e das diluições prévias.

6.1.8. Solução tampão de tetraborato de sódio (borato 40 mM)

A solução A é preparada pela dissolução de 3,81g de tetraborato de sódio dodecahidratado ( $\text{PM}=381,37$ ) em 1000 mL de água d/d. Esta solução possui molaridade de 10 mM de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , o que corresponde à 40 mM de borato. A solução B é preparada pela dissolução de 2,48 g de ácido bórico ( $\text{PM}=61,83$ ) em 1000 mL de água d/d. Esta solução possui molaridade de 40 mM de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Para o preparo do tampão, adicionar solução B na solução A até o pH desejado. Se necessário, utilizar NaOH 100 mM para ajuste.

6.1.9. Eletrólito (BGE) para eletroforese capilar (tampão borato 20 mM - pH 10,0)

Diluir a solução tampão de borato 40 mM pH 10,0 com água d/d. Filtrar em unidade filtrante descartável com membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### 6.1.10. Fase móvel LC-MS/MS

Solvente A - Acetonitrila e ácido trifluoroacético ( $\text{CH}_3\text{CN} + 0,05\% \text{ TFA}$ ); Solução B - Água d/d ( $\text{H}_2\text{O} + 0,05\% \text{ TFA}$ ). A eluição é realizada com um gradiente linear de solvente B em A de 35% a 55% por 30 minutos.

#### 6.1.11. Solução de fluorescamina 20 mM

Dissolver 1,1 g de fluorescamina em acetona PA e levar à volume em balão volumétrico de 200 mL.

### 6.2. Preparo de amostras

6.2.1. Precipitação das amostras de leite fluido ou leite em pó reconstituído e das amostras de curva de calibração  
. Pipetar, para um copo de béquer ou frasco similar, 10 mL de leite.

. Adicionar lentamente, com auxílio de uma bureta, 5 mL de solução de TCA 24%, sob agitação constante.

. Deixar em repouso por  $60 \pm 5$  minutos em temperatura ambiente.

. Filtrar por filtro de papel, descartando as primeiras gotas do filtrado.

. O filtrado é injetado diretamente no sistema de HPLC ou sofre purificação posterior.

. Se necessário, filtrar por membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  antes da injeção, quando a amostra se apresentar turva.

#### 6.2.2. Curva de calibração

A curva de calibração é feita em matriz, isto é, alíquotas de amostra branca (leite cru recém-ordenhado) fortificadas conforme Tabela 2. Deve-se proceder à fortificação dispensando diretamente sobre amostra branca o volume apropriado da solução de fortificação, agitando suavemente e deixando em repouso por aproximadamente 15 minutos.

Tabela 2. Preparação da curva de calibração em matriz.

Ponto	Concentração ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	Volume solução-estoque (mL)	Volume amostra branca (mL) - qsp 10 mL
1	25	0,5	19,5
2	50	1,0	19,0
3	75	1,5	18,5
4	100	2,0	18,0
5	200	4,0	16,0

Observação: a mesma curva pode ser usada para curva de produtos de digestão para análise em LC-MS/MS, levando em conta a diluição que deve ser realizada.

6.2.3. Preparação de amostras fortificadas para avaliação da recuperação

Em copo de béquer ou frasco, adicionar 19 mL de leite "branco" (sabidamente ausente de CMP e/ou pseudo-CMP) e 1 mL de solução-padrão estoque ( $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). A concentração nominal desta amostra é de  $50\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  e o cálculo da recuperação deve ser feito comparando a área do pico de CMP desta amostra com a do ponto 2 da curva, que também possui concentração nominal de  $50\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

A figura 2 abaixo sintetiza o modo de preparo de amostras, padrões e recuperados.



## PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA CASA CIVIL IMPrensa NACIONAL

LUIZ INÁCIO LULA DA SILVA  
Presidente da República

DILMA VANA ROUSSEFF  
Ministra de Estado Chefe da Casa Civil

ERENICE ALVES GUERRA  
Secretária Executiva da Casa Civil

FERNANDO TOLENTINO DE SOUSA VIEIRA  
Diretor-Geral da Imprensa Nacional

### DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO SEÇÃO 1

Publicação de atos normativos

JORGE LUIZ ALENCAR GUERRA  
Coordenador-Geral de  
Publicação e Divulgação

ALEXANDRE MIRANDA MACHADO  
Coordenador de Editoração e  
Divulgação Eletrônica dos Jornais Oficiais

FRANCISCO DAS CHAGAS PEREIRA  
Coordenador de Produção

A Imprensa Nacional não possui representantes autorizados para a comercialização de assinaturas impressas e eletrônicas

<http://www.in.gov.br> ou [ouvidoria@in.gov.br](mailto:ouvidoria@in.gov.br)  
SIG, Quadra 6, Lote 800, CEP 70610-460, Brasília - DF  
CNPJ: 04196645/0001-00  
Fone: 0800 725 6787