

SAULO DE TARSO ZACARIAS MACHADO

Validação de método para detectar resíduos de ivermectina em leite bovino

São Paulo

2015

SAULO DE TARSO ZACARIAS MACHADO

Validação de método para detectar resíduos de ivermectina em leite bovino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada à Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada à Zoonoses

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Evelise Oliveira Telles

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3154
FMVZ

Zacarias Machado, Saulo de Tarso
Validação de método para detectar resíduos de ivermectina em leite bovino / Saulo
de Tarso Zacarias Machado. -- 2015.
40 f. : il.

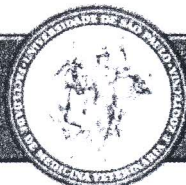
Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profª. Drª. Evelise Oliveira Telles.

1. Ivermectina. 2. Resíduos. 3. Leite. 4. HPLC. 5. Fluorescência. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Validação de método para detectar resíduos de IVM em leite bovino", protocolado sob o nº 2928/2013, utilizando 03 (três) bovinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 28/11/2012.

We certify that the Research "Method validation for detecting residues of ivermectin in milk", protocol number 2928/2013, utilizing 03 (three) bovine, under the responsibility Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/28/2012.

Certificamos, também, que o projeto de nº2928, acima mencionado, é parte do projeto intitulado "Cinética da Ivermectina e quantificação de resíduos em leite, queijo tipo mussarela e soro utilizado na produção de ricota.", protocolado sob o nº 2806/2013, utilizando 24 (vinte e quatro) bovinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, aprovado em reunião de 28/11/2012.

São Paulo, 20 de maio de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MACHADO, Saulo de Tarso Zacarias

Título: **Validação de método para detectar resíduos de ivermectina em leite bovino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada à Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Rosangela e Célio pelo amor, carinho e apoio, sempre me inspirando a ser a minha melhor versão.

AGRADECIMENTOS

À Professora Evelise Oliveira Telles, por acreditar em meu potencial, por todo apoio e orientação e pela oportunidade de aprendizado.

À Professora Solange Maria Gennari e Aline Rodrigues Rezende pelo auxílio, compreensão e direcionamento durante a evolução do projeto.

Ao Professor Carlos Adam Conte Junior da Universidade Federal Fluminense, por abrir as portas e possibilitar o conhecimento de territórios que antes desconhecia.

A toda equipe do Centro Laboratorial Analítico da Universidade Federal Fluminense pela hospitalidade e confiança, especialmente César Aquiles Lázaro de la Torre e Marion Pereira da Costa pelo acompanhamento, ensinamentos, paciência e disposição para sempre solucionar problemas e dúvidas. Aos funcionários, Wagner Alves e Cristina Marçal Lima Silveira por sempre estarem dispostos a ajudar no fim do dia.

Aos colegas da Universidade Federal Fluminense, Beatriz Frazão, Bruna Rodrigues e Rodrigo Vilela por me receberem, ajudando na adaptação a um ambiente diferente, sempre com bom-humor e boa vontade. Hugo Azevedo e Nathália Miranda Coutinho pela companhia, risadas e palavras de conforto, sempre deixando o cotidiano um pouco mais divertido.

Às colegas de pós-graduação Léia Silva, Gisele Oliveira de Souza e Cássia Ikuta pela amizade e incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Danival Lopes Moreira e Sandra Abelardo Sanches por todo o auxílio durante compra de materiais, passagens e esclarecimentos de eventuais dúvidas.

À funcionária da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da FMVZ/USP, Elza Faquim, por toda ajuda, paciência, disponibilidade e ensinamentos durante a escrita da dissertação.

E finalmente, gostaria de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o mestrado e o Programa de Pós Graduação da FMVZ/USP pelo financiamento, possibilitando o estudo e a produção do projeto.

“Mestre não é quem sempre ensina, mas aquele que de repente aprende”

João Guimarães Rosa

RESUMO

MACHADO, S. T. Z. **Validação de método para detectar resíduos de ivermectina em leite bovino.** [Method validation for detecting ivermectin residues in milk]. 2015. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Níveis não aceitáveis de resíduos de ivermectina (IVM), uma droga anti-parasitária amplamente utilizada no Brasil para controle de endectoparasitas, pode estar presente no leite para consumo humano se administrada incorretamente. O nível máximo de resíduos no leite para este composto é de 10 ng mL⁻¹ e sua presença tem sido comprovada em pesquisas realizadas por órgãos reguladores. Com o conhecimento deste problema, um método para a detecção de ivermectina em amostras de leite foi desenvolvido utilizando a extração líquido-líquido com base em acetonitrila e hexano, seguida por derivatização com 1-metilimidazol (MI), trietilamina (TEA), ácido anidro trifluoroacético (TFAA) e ácido trifluoroacético (TFA) e cromatografia líquida com detecção fluorescente (LC-FL) para a análise. Além disso, o método proposto foi testado de acordo com parâmetros de validação estabelecidos pela ANVISA. Parâmetros, tais como seletividade, linearidade ($R^2 \geq 0,98$), precisão (coeficiente de variação entre 0,6-19%), recuperação (90-95%) e robustez foram avaliados durante o processo de validação. Subsequentemente, foi testado em amostras de leite de vacas tratadas com uma formulação comercial de ivermectina a 1%. O método aplicado em amostras de campo, provou possuir um perfil de quantificação e de confirmação para o método concebido no presente estudo.

Palavras-chave: Ivermectina. Resíduos. Leite. HPLC. Fluorescência.

ABSTRACT

MACHADO, S. T. Z. **Method validation for detecting ivermectin residues in milk.** [Validação de método para detectar resíduos de ivermectina em leite bovino]. 2015. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Non-acceptable residue levels of ivermectin (IVM), an anti-parasitic drug widely employed in Brazil for control of endectoparasites, could be present in milk for human consumption if improperly administered. The maximum residue level in milk for this compound is 10 ng mL⁻¹ and its presence has been proved from previous government surveys. With this rising subject, a method for the detection of ivermectin in milk samples was developed using liquid-liquid extraction based in acetonitrile and hexane, followed by derivatization with 1-methylimidazole (MI), triethylamine (TEA), anhydrous trifluoroacetic acid (TFAA) and trifluoroacetic acid (TFA) and liquid chromatography coupled to fluorescent detection (LC-FL) for the analysis. Moreover, the proposed method was tested according to validation parameters established by ANVISA. Parameters, such as selectivity, linearity ($R^2 \geq 0.98$), precision (RSD values between 0.6 – 19%), recovery (90-95%) and robustness were evaluated during the validation process. Subsequently it was tested in milk samples from cows treated with a commercial ivermectin formulation at 1%. The method applied to field samples, proved a quantifiable and confirmatory profile for the method designed in this study.

Keywords: Ivermectin. Residue. Milk. HPLC. Fluorescence.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Cromatograma demonstrando as amostras de leite branco. A imagem sobreposta é um corte ampliado mostrando a ausência de picos no tempo de retenção avaliado 26
- Figura 2 - Cromatograma da solução de IVM padrão na concentração de 40 ng mL⁻¹, demonstrando o tempo de retenção do pico de IVM..... 26
- Figura 3 - Cromatograma das amostras de leite fortificadas na concentração de 80 ng mL⁻¹ mostrando o mesmo tempo de retenção e ausência de picos interferentes 27
- Figura 4 - Resultados de seletividade para solução de IVM padrão e amostras de leite fortificadas 27
- Figura 5 - Curva de calibração para solução de IVM padrão, exibindo equação de regressão e R²..... 28
- Figura 6 - Curva de calibração para amostras de leite fortificadas, exibindo equação de regressão e R²..... 29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da seletividade para amostras de leite fortificadas expressas em média, desvio padrão e coeficiente de variação.....	28
Tabela 2 - Resultados de repetibilidade para amostras de leite fortificadas expressos em média, desvio padrão e coeficiente de variação.....	29
Tabela 3 - Resultados da precisão intermediária para ambos os analistas, em dois dias, expressos em média, desvio padrão e coeficiente de variação.....	30
Tabela 4 - Resultados de recuperação para as concentrações de 20,0 e 40,0 ng mL ⁻¹ expressas em media, desvio padrão e coeficiente de variação	31
Tabela 5 - Tempo de retenção e média de tempo de retenção para o pico de IVM em uma corrida sem alteração de parâmetros.....	31
Tabela 6 - Tempo de retenção, média de tempo de retenção e tempo de retenção relativo para as alterações de fluxo.....	32
Tabela 7 - Tempo de retenção, média de tempo de retenção e tempo de retenção relativo para as alterações de gradiente	32
Tabela 8 - Áreas e média das áreas abaixo do pico de IVM com tempo de aquecimento de 30 minutos e 40 minutos	33
Tabela 9 - Níveis de concentração de IVM encontrados no leite de vacas tratadas com IVM coletado em 1, 3, 7, 14 e 21 dias, após administração, apresentados com média, desvio padrão (DV) e coeficiente de variação (CV).....	34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrila
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPA: Boas Práticas Agropecuárias
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV: Coeficiente de Variação
DP: Desvio Padrão
ELISA: Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
FL: Fluorescência
GABA: Ácido Gama Aminobutírico
IDA: Ingestão Diária Aceitável
IM: Intra Muscular
IVM: Ivermectina
LD: Limite de Detecção
LLE: Extração Líquida-Líquida
LM: Lactonas Macrocíclicas
LMR: Limite Máximo de Resíduos
LQ: Limite de Quantificação
LTP: Precipitação à Baixa Temperatura
MAPA: Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MI: 1-Metilimidazol
MS: Espectrometria de Massas
PAMVet: Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal
PNCRC: Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
SC: Subcutânea
SPE: Extração de Fase Sólida
TEA: Trietilamina
TFA: Ácido trifluoracético
TFAA: Ácido Anidro Trifluoracético
TR: Tempo de Retenção
UV: Ultravioleta
VO: Via Oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Fármacos e Reagentes.....	21
3.2	Preparo da solução de IVM padrão e fortificação das amostras de leite branco.	21
3.3	Preparo das amostras	21
3.4	Condições Cromatográficas	22
3.5	Parâmetros de validação	23
3.6	Aplicação do método em amostras de leite de animais tratados.....	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A produção de leite no Brasil, no primeiro trimestre de 2014, teve aumento de 8,9% em relação ao mesmo período do ano anterior, chegando a 6,186 bilhões de litros adquiridos pelas indústrias processadoras. Além disso, a exportação no 1º trimestre de 2014 aumentou 106,4% em relação ao fim de 2013. Os principais países importadores foram Bolívia, Venezuela, Sri Lanka e África do Sul (IBGE, 2014).

A partir do crescimento gradativo da produção brasileira e do aumento das exportações de leite, há necessidade de garantir a inocuidade do leite também no tocante aos perigos químicos e, assim, os resíduos de medicamentos veterinários têm estado em pauta.

A criação intensiva é caracterizada pela aglomeração de animais, facilitando a disseminação de doenças parasitárias; no entanto a criação a pasto também é vulnerável a essas enfermidades, uma vez que o clima tropical é marcado por variações de temperatura, períodos de seca e períodos de chuvas intensas. Espaço limitado e os fatores climáticos interferem na saúde do gado na produção de leite, além de criar um ambiente ideal para a reprodução e disseminação de endo e ectoparasitas (carrapatos, moscas, míases, parasitas gastrointestinais) (COSTA; PEREIRA NETTO, 2012; FEIJÓ, 2012).

O uso de antiparasitários é a principal forma de combater as perdas de produção, porém a utilização inadequada acaba gerando resíduos em níveis acima do aceitável no leite para consumo humano, além de possibilitar o surgimento de resistência parasitária aos medicamentos. Entre as drogas antiparasitárias disponíveis no mercado, as lactonas macrocíclicas (LM) destacam-se pelo amplo espectro de ação, eficácia em baixas doses, utilização segura na maioria dos mamíferos e custo relativamente baixo. As lactonas são um grupo de moléculas que possuem efeito endectocida, produzidas a partir da fermentação do *Streptomyces avermectilis*, um microrganismo que tem como hábitat o solo. Após a descoberta desses componentes, foram produzidos diversos fármacos, como a ivermectina (IVM), que foi patenteada há mais de 20 anos e mantém-se até hoje como uma das drogas antiparasitárias mais populares mundialmente (DANAHER et al., 2006; COSTA; PEREIRA NETTO, 2012).

Existem diversas variações no mercado de formulações medicamentosas para uso veterinário contendo IVM, diferenciando-se desde a concentração que pode ser de 1% até 3,5%, bem como combinações com diferentes moléculas, além de veículos e adição de adjuvantes. As mudanças nas apresentações têm a finalidade de melhorar a eficácia do tratamento,

aumentando o período de liberação e o tempo de ação no organismo. No entanto, quanto maior a dosagem e concentração, maior o nível de resíduos e, conseqüentemente, apresenta maior período de carência. As medidas que permitem o uso seguro desses compostos estão baseadas nas Boas Práticas de Agropecuárias (BPA), como utilização do produto para a espécie a que se destina, a via de administração recomendada para o medicamento, a dosagem e o cumprimento do período de carência. Todas essas informações estão contidas na bula.

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos Animais (PNCRC), coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2007), é responsável por monitorar o nível de resíduos. Adotando-se a regulamentação do *Codex Alimentarius*, o Brasil determinou o Limite Máximo de Resíduos (LMR) para IVM em 10 µg/kg no leite (CODEX ALIMENTARIUS, 2014). Portanto, há a necessidade de métodos sensíveis e confiáveis que detectem concentrações menores ou iguais ao LMR.

A disponibilidade de métodos para a quantificação dessas moléculas em matrizes orgânicas é limitada, contemplando a cromatografia e métodos imunoquímicos como ELISA. Em métodos cromatográficos, são necessários instrumentos de detecção, sendo os mais utilizados: ultravioleta (UV), fluorescência (FL) e espectrometria de massas (MS). Porém, o processo de extração para leite e matrizes derivadas é complicado e longo, necessitando precipitação de proteínas e filtração de impurezas, e quando não bem sucedido, pode gerar falhas na sensibilidade e especificidade no método de detecção (DANAHER et al., 2006; RÜBENSAM, 2010; GIANNETTI et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver, validar e, subseqüentemente, testar um novo método visando características como praticidade e rapidez na execução, eficácia e confiança nos resultados obtidos e baixo custo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A Ivermectina foi a primeira avermectina a ser comercializada no ano de 1981 e tem como classificação molecular 22-23 dihidroavermectina. Composta pela mistura de duas moléculas homólogas em proporções diferentes, ela possui pelo menos 80% de 22-23 dihidroavermectina B1a e pelo menos 20% de 22-23 dihidroavermctina B1b, sendo a B1a considerada como o marcador principal para ensaios de determinação de resíduos em leite e tecidos (SCHENCK; LAGMAN, 1999; JESUS, 2007; KOLBERG et al., 2009).

Sua ação contra artrópodes e nematóides em suas diversas formas de desenvolvimento garante um amplo espectro de ação e eliminação eficaz desses parasitas. A dose recomendada para a espécie bovina é 200 µg por kg de peso vivo. Os principais nematódeos afetados são *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp., *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Strongyloides papillosus*, *Bunostomum* spp., *Nematodirus* spp., *Trichuris* spp., *Oesophagostomum* spp., *Dictyocaulus viviparus*, enquanto os artrópodes susceptíveis são *Hypoderma* spp., *Sarcoptes bovis*, *Psoroptes ovis*, *Linognathus* spp. e *Haematopinus* spp. O modo de ação neural é iniciado quando a molécula se liga irreversivelmente à célula neuromuscular, causando a liberação de neurotransmissores inibitórios, como ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina ou glutamato. A liberação dessas substâncias pela extremidade pré-sináptica aumenta o fluxo do íon Cl^- , levando à hiperpolarização da membrana. Esse mecanismo causa paralisia muscular nos parasitas, inclusive na bomba faríngea, inibindo o processo de alimentação e causando a sua morte (SOUZA et al., 2003; DANAHER et al., 2006; RÜBENSAM, 2010).

A IVM é altamente lipofílica, depositando-se na gordura e garantindo lenta liberação no organismo. Sua excreção pode ser por períodos prolongados no leite, podendo atingir até 5% da dose administrada, além de se depositarem em outros tecidos como fígado, rins e, em menor proporção, músculos (KOLBERG et al., 2009; CERKVENIK-FLAJS et al., 2010). O princípio ativo, IVM, pode estar presente em diferentes formulações para uso veterinário. Estas podem apresentar diferentes concentrações e diferentes componentes secundários (veículos, adjuvantes, excipientes, etc.), destinadas à administração por diversas vias, como tópica, subcutânea, oral ou intramuscular. Essas variações levam a meias-vidas médias no plasma e períodos de carência diferentes. De fato, algumas dessas formulações são desenvolvidas exatamente para que tenham absorção e eliminação lentas. Embora tal protocolo de medicação possa ser interessante do ponto de vista da praticidade de tratamento dos animais, ele pode aumentar o tempo em que os resíduos são eliminados em quantidade

elevada no leite e produtos derivados após o tratamento. Apesar de diversas vias de administração, a biodisponibilidade da IVM é melhor quando aplicada via subcutânea (SC), seguida da via oral (VO) e da via tópica. Esta via apresenta áreas abaixo da curva de absorção menores na dose de 500 µg/kg que 200 µg/kg. Quando administrada por via parenteral, a absorção é mais lenta, porém mais eficaz do que na VO, pois aumenta a biodisponibilidade no plasma, levando à ação por um longo período. Além da melhor ação através da via SC, a IVM também é pouco hidrossolúvel, favorecendo a lenta absorção na região aplicada e um longo período de ação na circulação. Pensando nas variações farmacocinéticas devido às vias de administração, as indústrias farmacêuticas oferecem diversas formulações no intuito de melhorar a ação antiparasitária. Veículos à base de propilenoglicol: glicerol-formal (60/40 v/v) são muito comuns, porém, quando alterados para veículo aquoso, a absorção é aprimorada, aumentando a meia-vida do fármaco e sua eficácia, enquanto na via intramuscular (IM) esse resultado é atingido quando usado veículos oleosos, devido à maior irrigação desse tecido. Em comparação, o veículo à base de óleo é absorvido mais lentamente pela via SC do que o veículo à base de propilenoglicol: glicerol-formal, pois há uma lenta liberação do sítio de aplicação. Após absorção, independente da via de administração, na corrente sanguínea a IVM liga-se a proteínas carreadoras (albumina; lipoproteínas) levando a sua distribuição nos órgãos-alvo, acúmulo no tecido adiposo e biotransformação no fígado, porém essa etapa ocorre em baixa escala, podendo ser excretada sem grandes modificações. As principais vias de excreção são bile e fezes (90%), urina (~2%) e também glândula mamária, devido ao depósito dessa molécula no tecido adiposo. A parcela excretada via leite pode chegar a 5,5% da dose administrada, dando grande importância ao período de carência pós-administração (GONZÁLEZ CANGA et al., 2009).

A Ingestão Diária Aceitável (IDA), isto é, a quantidade máxima teórica de uma dada substância que pode ser ingerida diariamente de forma segura por humanos, é de 0,6 mg/kg/dia para a IVM (FAO/WHO, 2014).

Em função da IDA, foi estabelecido o LMR de IVM em 10 µg/kg no leite, considerando-se a ingestão média de leite na população de referência (CODEX ALIMENTARIUS, 2014; FAO/WHO, 2014).

Em países da União Europeia não há LMR, pois o uso de IVM em animais produtores de leite é proibido, portanto não deve haver resíduos no produto final ou derivados. No Brasil, foram adotadas as normas do *Codex Alimentarius*, que estabelecem a quantidade aceitável de resíduos, mas, apesar de existir um LMR, as empresas farmacêuticas recomendam que IVM não seja administrado no gado leiteiro.

O PNCRC, coordenado pelo MAPA, é responsável por monitorar os níveis de resíduos de drogas. Em análises de leite cru, conduzidas no período de 2004 a 2014, foram detectadas 9 amostras positivas, com os resultados que excedem o LMR de um total de 896 amostras (BRASIL, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015). Outro programa desenvolvido, denominado PAMvet (Programa de Análise de resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal), projetado pelo Ministério da Saúde por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), atuou de 2003 até 2007, analisando um total de 1.575 amostras de leite pasteurizado ou UHT amostras leite comercial (ANVISA 2005, 2006, 2009). Destas, foram confirmadas 556 amostras positivas para os resíduos de IVM, porém nenhuma acima do LMR. O método de determinação escolhido pelo programa do MAPA foi a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à detecção por fluorescência (CLAE-FL), enquanto a ANVISA manteve essa técnica apenas incluindo detectores de UV (CLAE-FL/UV).

Alguns autores levantaram dados sobre os resíduos de IVM no leite vendido em estabelecimentos comerciais. Lobato et al. (2006) desenvolveram uma metodologia de CLAE-FL com limites de quantificação e de detecção abaixo do LMR (2,0 ng/mL e 0,6 ng/mL, respectivamente) e, das 168 amostras analisadas, aproximadamente 30 (17,8%) foram positivas para IVM, mas em todas o valor encontrado estava abaixo do LMR. Recentemente, no estado do Rio Grande do Sul, foi executado um trabalho similar no qual 72 amostras comerciais foram analisadas com cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massas (CLAE-MS) e, das 18 amostras positivas (22,2%), nenhuma excedeu o LMR (SOUZA, 2013).

Derivados lácteos também podem apresentar resíduos desse medicamento, uma vez que o processamento do leite não elimina ou diminui a quantidade presente no leite cru (IMPERIALE et al., 2009). No intuito de pesquisar resíduos em derivados, um trabalho realizado na cidade de Campinas, no Estado de SP, coletou 104 amostras comerciais de iogurte para análise com CLAE-FL, e nenhuma apresentou resíduos de IVM (FURLANI et al., 2015).

A detecção de resíduos, mesmo em valores abaixo do LMR, evidencia o uso de IVM em vacas em lactação, o que não é recomendado pelos fabricantes.

A presença desse composto em níveis não aceitáveis nos alimentos destinados aos humanos pode apresentar efeitos tóxicos à saúde. Há estudos que demonstram os efeitos mutagênicos e/ou teratogênicos em outras espécies de mamíferos, além de resistência parasitária ao medicamento, devido ao uso indiscriminado (EMEA, 2004). Porém existem poucos relatos de

toxicidade em humanos causados por IVM (SUNG et al., 2009; DEBONIS; PIERRE, 2011), mas trabalhos realizados com culturas de células *in vitro* demonstraram um possível caráter citotóxico e genotóxico contra determinadas linhagens celulares (MOLINARI; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2010).

Um fator essencial para o metabolismo da IVM no organismo dos mamíferos é a glicoproteína-P, uma proteína expressa na superfície da membrana celular. Sua presença influencia na absorção, inclusive no epitélio intestinal (principalmente quando administrada VO). Algumas formulações acompanhadas de verapamil, um bloqueador da glicoproteína-P, permitem que a biodisponibilidade e a concentração no plasma sejam aumentadas, causando uma melhora na eficácia antiparasitária (GONZÁLEZ CANGA et al., 2009). Porém, é fato que animais com deficiência da glicoproteína-P (ex: cães da raça Collie), estão suscetíveis à intoxicação por esse antiparasitário. De acordo com Macdonald e Gledhill (2007), humanos podem apresentar polimorfismo na glicoproteína-P através de mutações, o que poderia gerar um potencial para toxicidade, caso essa variação impeça essa estrutura de realizar sua função. Devido aos riscos toxicológicos, é importante controlar os resíduos dessa molécula em alimentos de origem animal como o leite. A cromatografia tem se mostrado muito útil na quantificação de resíduos farmacêuticos em matrizes orgânicas e é uma técnica que permite a separação de componentes semelhantes presentes em matrizes complexas através de diversos métodos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2009). O princípio desta técnica está na diferenciação de analitos em uma mistura através da interação individual com diferentes elementos, como a fase móvel e a fase estacionária. Esses elementos podem ser variados, abrangendo várias técnicas para diversas estruturas (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). A CLAE é um método de determinação de resíduo popularmente usado para leite bovino, devido à sua sensibilidade, precisão e exatidão (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2009; SANTOS, 2013).

Métodos pioneiros de extração baseavam-se em extração de fase sólida e partição líquido: líquido, utilizando-se a determinação e detecção por CLAE e UV, respectivamente. No entanto, houve o surgimento de métodos que empregavam a derivatização após a extração, adicionando reagentes ao analito extraído os quais formavam um composto fluorescente, permitindo a detecção por fluorescência que, por sua vez, aumentou a sensibilidade dos métodos (STONG, 1987; PRABHU; WEHNER; TWAY, 1991). Diante da impossibilidade de analisar a matéria bruta, o preparo das amostras é essencial para isolar e concentrar o analito, além de separar impurezas que podem causar danos no equipamento e/ou prejudicarem a análise (VALENTE; AUGUSTO, 2000). As técnicas de extração de fármacos de matrizes

biológicas, anteriormente à injeção no equipamento de CLAE, são: extração em fase sólida (SPE), precipitação por baixas temperaturas (LTP) e extração líquido:líquido (LLE). Esta última é a mais empregada devido à praticidade e baixo custo, porém necessita de grandes volumes de solvente e maior tempo de análise.

Resíduos de lactonas macrocíclicas podem ser mensurados quantitativamente através de cromatografia líquida com posterior detecção por UV, ou por fluorescência ou ainda por espectrometria de massas. A escolha do método depende da sensibilidade e especificidade desejada no ensaio. O alcance de detecção de resíduos por UV é até mg/kg, enquanto a espectrometria de massas e a detecção por fluorescência são capazes de mensurar até µg/kg. Considera-se a cromatografia associada à espectrometria de massas mais adequada para detecção de resíduos de lactonas macrocíclicas porque, apesar da fluorescência apresentar baixo custo e boa sensibilidade, seus derivados são muito instáveis, prejudicando a amostra após a extração (DANAHER et al., 2006). Porém a otimização dessa reação, selecionando reagentes e volumes apropriados, possibilita a utilização da derivatização com resultados precisos (DANAHER et al., 2012).

Outro método para a detecção das lactonas macrocíclicas, alternativo à cromatografia líquida, é a imunológica, que consiste na produção de anticorpos monoclonais (por ex. anti-ivermectina) para detecção através de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), porém há chance de reações cruzadas com outros fármacos e/ou metabólitos. Além disso, exige um procedimento de limpeza com mais etapas e tem alto custo. Assim, na escolha de um método para identificação da ivermectina, a cromatografia líquida demonstrou-se de fácil execução, com menos etapas de trabalho e uso de menos reagentes, além de garantir melhores resultados do que os métodos imunológicos (DANAHER et al., 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Fármacos e Reagentes*

Ivermectina (Cat. I8898-1g), trietilamina (TEA) (Cat. T0886-1L), ácido anidro trifluoracético 99% (TFAA) (Cat. 106232-500g), ácido trifluoracético (TFA) (Cat. T6508-500mL), 1-metilimidazol (MI) (M50834-100g) foram obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (SP, Brasil). Acetonitrila (ACN) e Hexano foram obtidos da Tedia Brazil (RJ, Brasil).

3.2 *Preparo da solução de IVM padrão e fortificação das amostras de leite branco.*

Solução de IVM padrão de estoque foi preparada ao dissolver 10,0 mg de IVM em 10,0 mL de acetonitrila, resultando em uma solução de 1,0 mg mL⁻¹. Para o preparo das soluções padrão de trabalho, uma alíquota de 10 µL foi retirada da solução de IVM padrão de estoque e adicionada a 9,9 mL de acetonitrila, produzindo uma solução de IVM padrão de trabalho na concentração de 1.000 ng mL⁻¹. Para os parâmetros de validação do método proposto, diferentes concentrações foram preparadas (160,0; 80,0; 40,0; 20,0; 10,0; 5,0 e 2,5 ng mL⁻¹), usando-se acetonitrila como solvente. Todas as soluções de IVM padrão foram armazenadas em freezer a -20 ° C.

Amostras de leite cru foram previamente testadas para garantir a ausência de IVM. A etapa de fortificação foi realizada através da adição de alíquotas específicas da solução de IVM padrão (1.000 ng mL⁻¹) com a finalidade de obter as mesmas concentrações citadas acima, porém no leite.

3.3 *Preparo das amostras*

A extração da matriz orgânica foi baseada em uma metodologia de extração líquida: líquida modificada, proposta por Gianetti et al. (2011). Apesar da maioria dos métodos para detecção

de lactonas macrocíclicas necessitem de uma etapa extra de limpeza utilizando-se cartuchos de SPE, o presente método foi produzido sem esse processo, apenas aplicando-se acetonitrila que já garante a precipitação de proteínas e a baixa co-extração de lipídios (SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ et al., 2012).

Descrevendo brevemente, 4 mL de ACN foram adicionados à 4 mL da amostra de leite, fortificada em tubos cônicos de polipropileno de 15 mL (Kasvi, São Paulo, Brasil) e homogeneizados em vortex (Certomat® MV, B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemanha) por 10 s. Logo após, a mistura foi submetida à banho ultrassônico (Cleaner USC 2800 A, São Paulo, Brasil) por 20 min. Em seguida, foi colocada em uma mesa agitadora (Biomixer, model TS-2000A VDRL, USA) por 20 min. A amostra foi, então, centrifugada (ST16R, Thermo Scientific, Germany) na rotação de 1,465g por 15 min à 10°C. O sobrenadante foi separado em tubos de polipropileno de 15 mL (Kasvi, São Paulo, Brasil), e o resíduo descartado. Foram adicionados 2 mL de Hexano seguido de breve homogeneização. Após essa etapa, a solução separou-se em duas fases, e 1 mL da fase superior foi cuidadosamente extraída, evitando-se obter alíquotas da fase inferior, e armazenadas em vials de CLAE de 1,5 mL (Tedia, RJ, Brasil). Para evaporação, os vials foram colocados abaixo de uma fraca corrente de nitrogênio (N₂) (Sample Concentrator Techne®, Cambridge, UK) em temperatura ambiente.

A etapa de derivatização foi realizada de acordo com o método proposto por Danaher et al. (2006). Após evaporação, o extrato seco foi ressuspensão com 100 µL de uma mistura de ACN:MI (1:1), 50 µL de TEA, 150 µL de uma mistura de ACN:TFAA (2:1), 50 µL de TFA e 1000 µL de ACN. Os vials foram transportados para banho-maria, onde foram aquecidos à 70° C por 30 minutos, seguido de 10 minutos à temperatura ambiente para esfriar e, assim, injetados no sistema de CLAE.

3.4 *Condições Cromatográficas*

O sistema cromatográfico consistia em um aparelho Prominence UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado com um degaseificador DGU-20A5, um injetor automático SIL-20AC, uma bomba quaternária LC-20AD, forno para fase estacionária CTO-20A, um detector de fluorescência RF-20Axs e um módulo de comunicação CBM-20A. A separação da IVM foi realizada em uma coluna C8 Waters SunFire (150 x 4,6 mm, 5 µm, Waters, USA) conectada a

uma coluna guarda (12,5 x 4,6 mm, 5 µm) com as mesmas características. A fase móvel era composta por uma mistura de ACN (A) e água Milli-Q (B). O fluxo foi de 1,2 mL/min. O gradiente de eluição foi construído da seguinte forma: iniciando à 88% de A, aumentando linearmente essa proporção até 97% de A, durante 8 min, e manteve-se esse gradiente até 15 min. Finalizado esse período, a proporção de A aumentou para 100% e foi mantido nesse valor até 25 min e, logo após, diminuído para 88% de A. O tempo total de corrida foi de 25 min. Em seguida, foi aplicado um fluxo isocrático de 88% de A, à 1,2 mL/min, durante 10 min, com a finalidade de limpar e estabilizar o sistema cromatográfico. A temperatura da coluna era de 30° C e o volume de injeção era de 20 µL. O comprimento de onda de excitação e emissão foram 365 nm e 470 nm, respectivamente. Os solventes foram degaseificados em banho ultrassônico anteriormente ao uso. Os resíduos de IVM foram identificados por seu tempo de retenção (TR) específico e quantificados pela área do pico, usando-se padrões externos.

3.5 *Parâmetros de validação*

Os parâmetros analíticos avaliados para a validação do método foram seletividade, linearidade, repetibilidade (precisão), precisão intermediária, recuperação, robustez, limite de quantificação e limite de detecção de acordo com as diretrizes nacionais (ANVISA 2003; ANVISA 2012).

A seletividade foi alcançada através da injeção de quatro concentrações diferentes (80,0; 40,0; 20,0 e 10,0 ng mL⁻¹) da solução de IVM padrão, comparando-se com amostras de leite fortificadas com as mesmas concentrações e as amostras de leite integral sem presença da IVM, para avaliar o efeito da matriz. Outro aspecto observado na seletividade foi o tempo de retenção do pico de IVM. A partir desses dados, também foram analisados média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV). Para esse parâmetro, as amostras foram preparadas em triplicata. A linearidade foi realizada injetando-se seis concentrações diferentes (80,0; 40,0; 20,0; 10,0; 5,0 e 2,5 ng mL⁻¹) de padrão de IVM diluído em ACN e amostras de leite fortificadas nas mesmas concentrações após extração e derivatização. Curvas de calibração linear foram construídas para ambos os tipos de amostras, calculando-se equação de regressão e coeficiente de regressão. As amostras foram preparadas em triplicata.

A precisão foi obtida em dois passos diferentes: repetibilidade e precisão intermediária. O primeiro foi projetado com três concentrações (40,0; 20,0 e 10,0 ng mL⁻¹), elaborado em triplicata, obtendo-se média, desvio padrão e coeficiente de variação. A precisão intermediária foi realizada injetando-se três concentrações (40,0; 20,0 e 10,0 ng mL⁻¹) preparadas em triplicata, embora por outros dois analistas (A e B), em dois dias (Dia 1 e Dia 2), no mesmo laboratório. A média, desvio padrão e coeficiente de variação também foram calculados para este passo.

A recuperação foi calculada com duas concentrações diferentes (40,0 e 20,0 ng mL⁻¹) do padrão de IVM diluído em acetonitrila. As mesmas concentrações foram comparadas em amostras de leite fortificadas. A equação de recuperação foi aplicada: $R = [(C-A)/B] \times 100$ (AOAC, 2002; ANVISA, 2003) em que A representa a amostra de leite na ausência de IVM, descartando-se o efeito da matriz; B é a solução de IVM padrão em ACN na determinada concentração; e C é a amostra de leite fortificada na concentração correspondente à B. Cada série de soluções foram preparadas em triplicata, e os resultados das equações expressos em porcentagem.

A robustez foi avaliada modificando-se três parâmetros: velocidade de fluxo, tempo de aquecimento (após a etapa de derivatização) e percentuais de gradiente. A velocidade de fluxo foi testada a 1,0 e 1,3 mL min⁻¹. O tempo de aquecimento foi alterado para 40 min. O percentual de gradiente foi alterado para iniciar em 11% e 13%. Para cada condição de corrida modificada, duas concentrações diferentes foram injetadas (40,0 e 20,0 ng mL⁻¹) três vezes cada. Após, foram calculados média, o desvio padrão e coeficiente de variação para o parâmetro alterado, comparando-se os resultados com as condições de corrida.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram obtidos por avaliação visual, observando-se a proporção de sinal:ruído para as concentrações menores.

Seguindo-se as normas de validação estabelecidas pela ANVISA, alguns parâmetros são avaliados de forma diferente. A linearidade deve obter um valor de $R^2 \geq 0,99$. Os valores de recuperação mais próximos de 100% são desejados, mas também aceitos dentro de uma faixa de 80 a 105%. O resultado do CV é a medida considerada relevante para seletividade, repetibilidade, precisão intermediária e também recuperação e deve ser $\leq 15\%$, enquanto para robustez as características observadas são a variação entre as medidas das condições normais de corrida e das condições alteradas, sem, no entanto, definir um intervalo de variação aceitável (ANVISA 2003; ANVISA 2012).

3.6 *Aplicação do método em amostras de leite de animais tratados.*

Três vacas (Mestiças) foram tratadas via SC com uma formulação comercial de IVM (IVOMECC® 1% Merial) na dosagem de 200 mcg ou $\mu\text{g kg}^{-1}$. As amostras de leite foram coletadas no dia 0 (antes do tratamento) e nos dias 1, 3, 7, 14, 21 de pós-tratamento e conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a conclusão da validação do método.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As imagens a seguir correspondem aos cromatogramas das amostras de leite branco (Figura 1) e solução de IVM padrão (Figura 2) comparando-se com as amostras de leite fortificadas (Figura 3), demonstrando a ausência de IVM e picos interferentes no tempo de retenção avaliado. O pico de IVM surge entre 12,00 e 13,00 minutos.

Figura 1 - Cromatograma demonstrando as amostras de leite branco. A imagem sobreposta é um corte ampliado, mostrando a ausência de picos no tempo de retenção avaliado

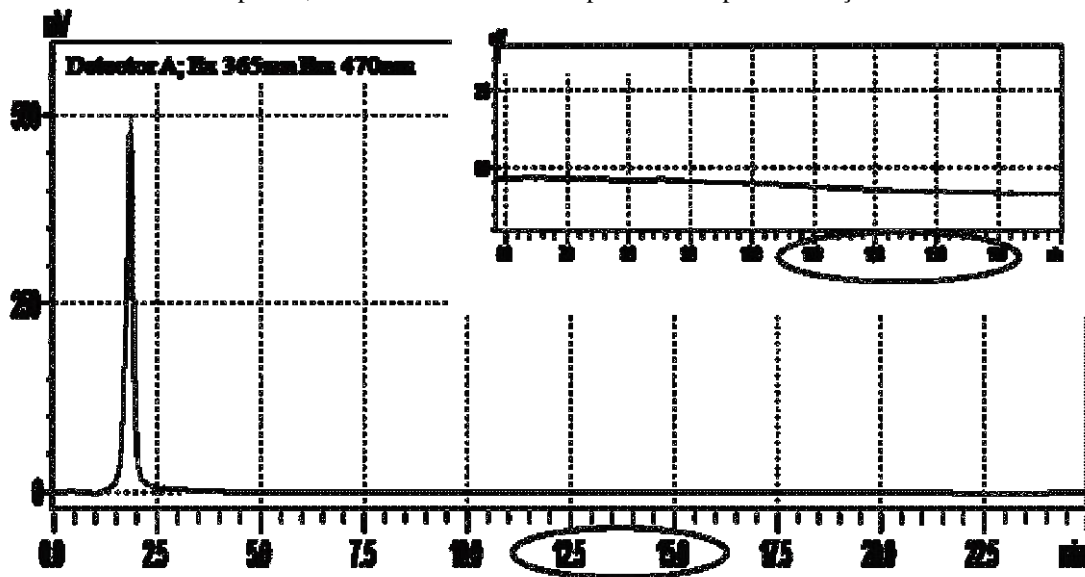


Figura 2 - Cromatograma da solução de IVM padrão na concentração de 40 ng mL⁻¹, demonstrando o tempo de retenção do pico de IVM

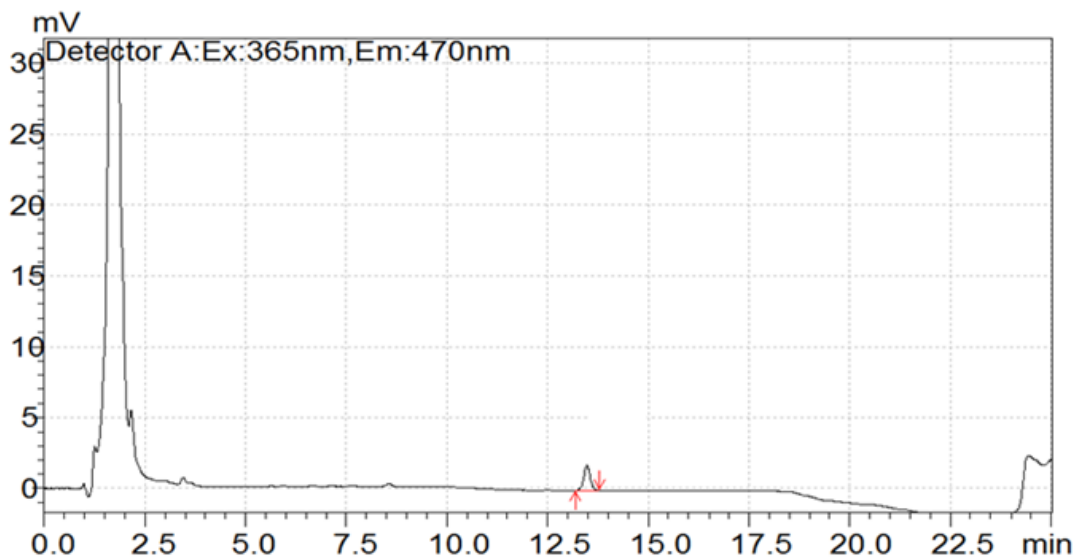
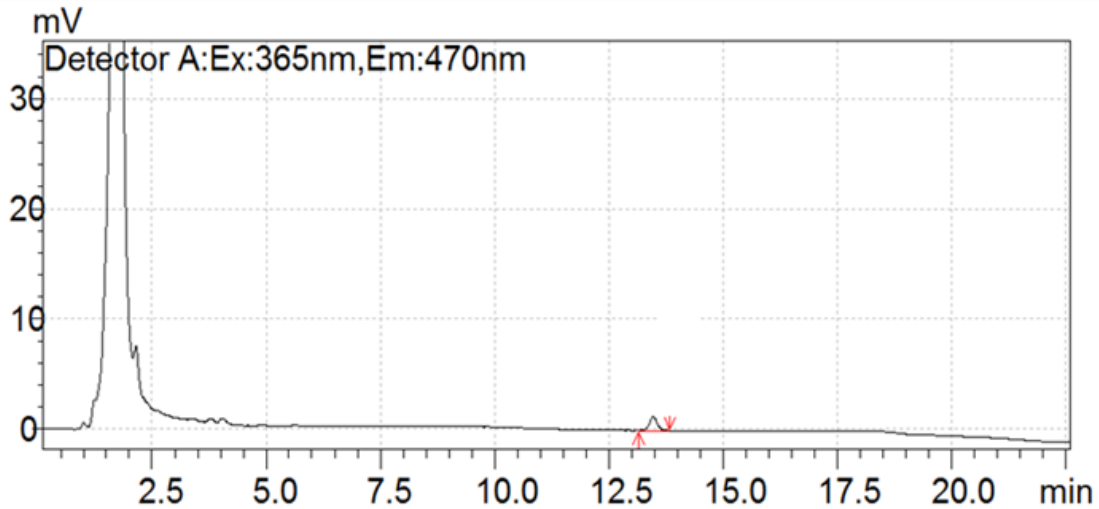


Figura 3 - Cromatograma das amostras de leite fortificadas na concentração de 80 ng mL⁻¹ mostrando o mesmo tempo de retenção e ausência de picos interferentes



Baseado em avaliação visual, os resultados para LD e LQ foram de 5,0 e 10,0 ng mL⁻¹, respectivamente.

A avaliação da seletividade foi executada através da comparação entre a solução de IVM padrão e as amostras de leite fortificadas (Figura 4). As curvas correspondendo à solução de IVM padrão e amostras de leite fortificadas apresentaram $R^2 \geq 0,99$ e não estavam completamente paralelas entre si, sugerindo interferência do efeito matriz; no entanto não houve picos interferentes no tempo de retenção avaliado, demonstrando o padrão seletivo do método. Os resultados de média, desvio padrão e coeficiente de variação estão detalhados na tabela 1.

Figura 4 - Resultados de seletividade para solução de IVM padrão e amostras de leite fortificadas

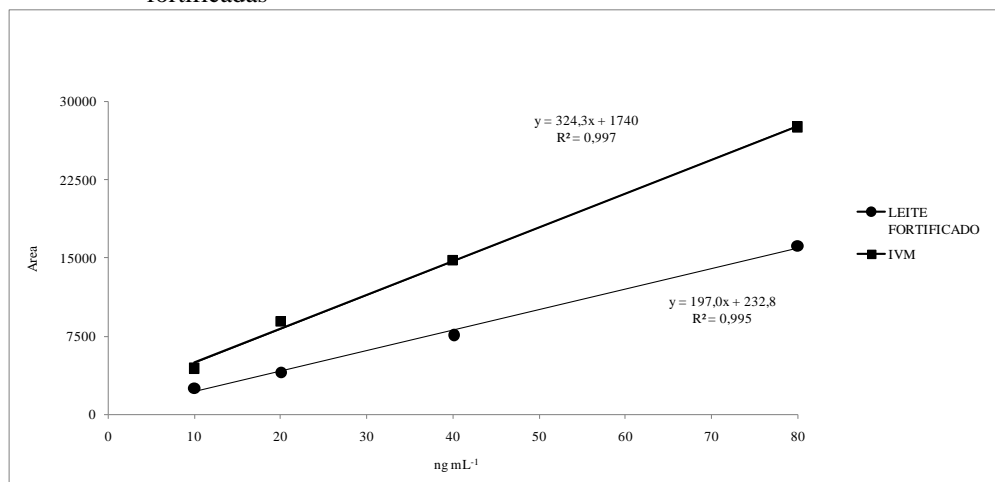


Tabela 1 - Resultados da seletividade para amostras de leite fortificadas expressas em média, desvio padrão e coeficiente de variação

CONCENTRAÇÃO (ng mL ⁻¹)	TR (min)	CONCENTRAÇÃO NA CURVA DE CALIBRAÇÃO (ng mL ⁻¹)	MÉDIA ± DP	CV (%)
10,0	A	12,902	10,09 ± 0.22	2,21
	B	12,912		
	C	12,898		
20,0	A	12,902	19,06 ± 0.42	2,24
	B	12,894		
	C	12,896		
40,0	A	12,890	39,03 ± 0.41	1,07
	B	12,908		
	C	12,903		
80,0	A	12,918	88,74 ± 1.85	2,08
	B	12,911		
	C	12,913		

Para avaliação da linearidade utiliza-se como referência o valor do R² da curva de calibração. Para construção da curva foram plotados os dados da concentração de IVM (solução padrão e leite fortificado) em função da área do pico de leitura. Foram utilizadas seis concentrações, incluindo o LD e um ponto mais baixo que correspondia à metade do LD. As figuras 5 e 6 mostram as curvas de calibração e as equações de regressão, nas quais se observa que os resultados obtidos do R² atendem ao critério do guia de validação da ANVISA (R² ≥ 0,99) (ANVISA 2003; ANVISA 2012).

Figura 5 - Curva de calibração para solução de IVM padrão, exibindo equação de regressão e R²

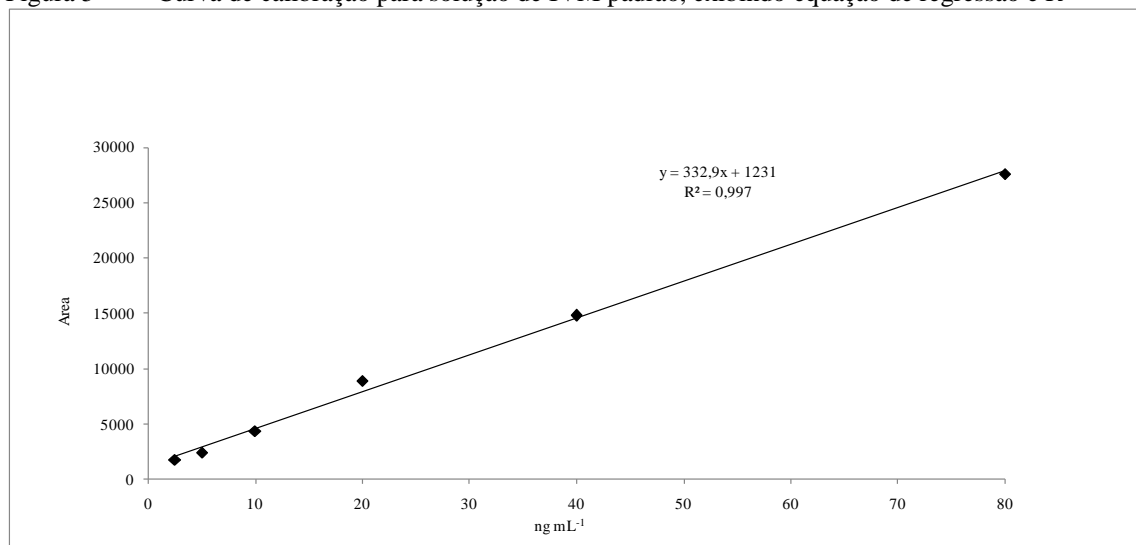
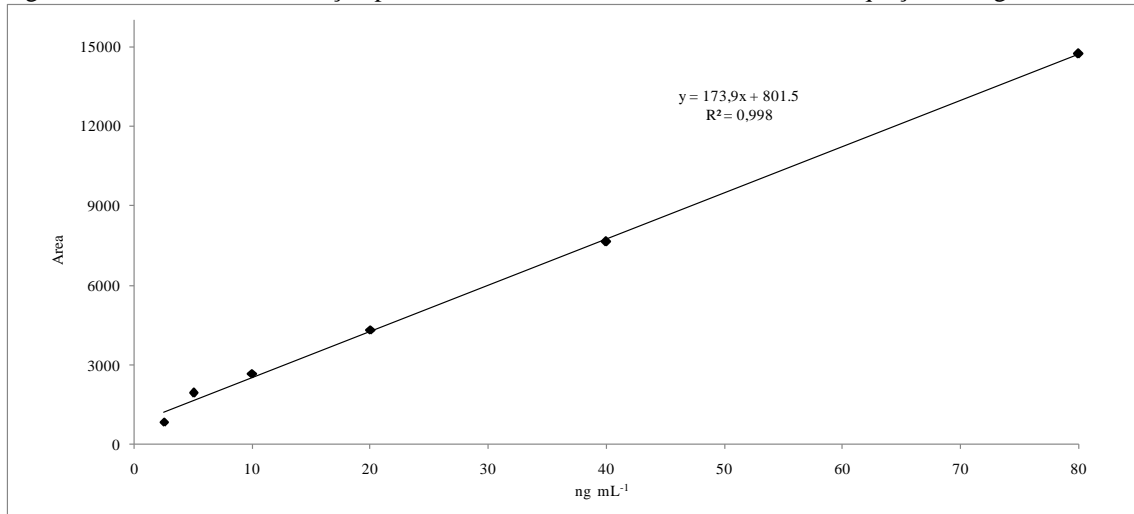


Figura 6 - Curva de calibração para amostras de leite fortificadas, exibindo equação de regressão e R²



Os resultados para o parâmetro repetibilidade foram aceitáveis de acordo com o guia de validação da ANVISA (CV < 15%)(ANVISA 2003; ANVISA 2012) para cada concentração. Os resultados de repetibilidade para três concentrações estão exibidos na tabela 2.

Tabela 2 - Resultados de repetibilidade para amostras de leite fortificadas expressos em média, desvio padrão e coeficiente de variação

CONCENTRAÇÃO (ng mL ⁻¹)	TR (min)	CONCENTRAÇÃO NA CURVA DE CALIBRAÇÃO		MÉDIA ± DP	CV (%)
			(ng mL ⁻¹)		
10,0	A	12,781	9,6	10,08 ± 0,33	3,32
	B	12,926	10,2		
	C	12,912	10,3		
20,0	A	12,885	19,9	19,85 ± 0,09	0,5
	B	12,887	19,8		
	C	12,874	19,7		
40,0	A	12,879	39,3	39,20 ± 0,22	0,56
	B	12,892	39,3		
	C	12,872	38,9		

Resultados para precisão intermediária foram um pouco abaixo do ideal. Ambos os analistas obtiveram bons valores de CV (<15%) (ANVISA 2003; ANVISA 2012) no primeiro dia, no entanto, no segundo dia, os resultados variaram. O analista A apresentou um valor de CV > 15% para a menor concentração (10 ng mL⁻¹), enquanto o analista B obteve um resultado similar com a concentração intermediária (20 ng mL⁻¹), além de concentrações, dentro da curva, diferentes das concentrações nominais. Os resultados de precisão intermediária para os analistas A e B, em dias diferentes, estão detalhados na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados da precisão intermediária para ambos os analistas, em dois dias, expressos em média, desvio padrão e coeficiente de variação

DIA	CONCENTRAÇÃO (ng mL ⁻¹)	TR (min)	CONCENTRAÇÃO NA CURVA DE CALIBRAÇÃO		MÉDIA ± DP	CV (%)
				(ng mL ⁻¹)		
1	10,0	A	12,852	13,63	13,44 ± 0,17	1,0
		B	12,802	13,33		
		C	12,830	13,33		
	20,0	A	12,912	25,07	24,47 ± 0,52	2,0
		B	12,813	24,14		
		C	12,811	24,19		
	40,0	A	12,817	53,10	50,51 ± 3,10	6,0
		B	12,955	51,36		
		C	12,935	47,06		
2	10,0	A	12,934	9,44	10,93 ± 2,05	18,8
		B	12,951	13,27		
		C	12,917	10,05		
	20,0	A	12,902	21,70	21,97 ± 1,57	7,2
		B	12,919	20,53		
		C	12,891	23,65		
	40,0	A	12,889	40,26	40,43 ± 0,15	0,4
		B	12,890	40,44		
		C	12,892	40,58		
ANALISTA B						
1	10,0	A	12,923	12,76	12,66 ± 0,24	1,8
		B	12,891	12,39		
		C	12,875	12,84		
	20,0	A	12,905	23,74	23,00 ± 0,80	3,4
		B	12,900	23,12		
		C	12,901	22,15		
	40,0	A	12,897	46,23	46,21 ± 2,60	5,6
		B	12,904	48,79		
		C	12,896	43,60		
2	10,0	A	12,878	8,70	8,82 ± 0,28	3,2
		B	12,878	9,14		
		C	12,870	8,61		
	20,0	A	12,873	17,10	15,84 ± 2,08	13,0
		B	12,868	16,93		
		C	13,396	13,44		
	40,0	A	12,906	31,82	30,37 ± 1,53	5,0
		B	12,910	28,75		
		C	12,905	30,52		

Aplicando-se a equação de recuperação, os valores obtidos foram $\approx 100\%$ para as concentrações de 20 e 40 ng mL⁻¹, porém uma das concentrações da solução de IVM padrão (40 ng mL⁻¹) apresentou um valor de CV > 15%, o que não é ideal. Os resultados da recuperação para as duas concentrações selecionadas são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados de recuperação para as concentrações de 20,0 e 40,0 ng mL⁻¹ expressas em média, desvio padrão e coeficiente de variação

	CONCENTRAÇÃO (ng mL ⁻¹)	TR (min)	CONCENTRAÇÃO NA CURVA DE CALIBRAÇÃO (ng mL ⁻¹)	MÉDIA ± DP	CV (%)	RECUPERAÇÃO (%)
SOLUÇÃO DE IVM PADRÃO	20,0	A	12,898	15,45	14,60 ± 1,55	11,0
		B	12,880	15,54		
		C	12,876	12,80		
	40,0	A	12,865	40,87	28,72 ± 10,63	37,0
		B	12,873	21,07		
		C	12,867	24,22		
LEITE FORTIFICADO	20,0	A	12,889	13,88	13,88 ± 0,03	95,0
		B	12,880	13,84		
		C	12,887	13,91		
	40,0	A	12,885	24,94	25,92 ± 1,87	7,0
		B	12,896	28,08		
		C	12,897	24,75		

As condições normais de corrida foram alteradas para avaliar a robustez e, mesmo com as alterações impostas, o método permitiu a obtenção de resultados similares. Utilizando-se como referência o tempo de retenção relativo, que é a diferença entre o tempo de retenção (12,00 – 13,00 minutos) e o tempo de retenção modificado, as mudanças esperadas para modificações no fluxo e gradiente foram pequenas, apresentando maior variação quando o fluxo foi diminuído e, mesmo assim, a diferença foi de apenas 1,5 minutos. Quando o tempo de aquecimento foi alterado, a média das áreas abaixo dos picos foi comparada com a média das áreas obtidas durante uma corrida sem alterações. No entanto, esses valores foram semelhantes. O tempo de retenção e a média dos tempos de retenção para as condições de corrida sem alteração (fluxo de 1,2 mL min⁻¹ e gradiente de 12%) estão detalhados na tabela 5. Para as alterações de fluxo e gradiente, os resultados estão apresentados na tabela 6 e 7, respectivamente. Os resultados das áreas abaixo do pico de IVM para o tempo de aquecimento sem alteração e tempo de aquecimento modificado estão detalhados na tabela 7.

Tabela 5 - Tempo de retenção e média de tempo de retenção para o pico de IVM em uma corrida sem alteração de parâmetros

	CONCENTRAÇÃO (ng mL ⁻¹)	TR (min)	MÉDIA DE TR (min)
CONDIÇÕES DE CORRIDA	20,0	A	12,952
		B	12,953
		C	12,946
	40,0	A	12,244
		B	12,963
		C	12,936

Tabela 6 - Tempo de retenção, média de tempo de retenção e tempo de retenção relativo para as alterações de fluxo

		CONCENTRAÇÃO (ng mL ⁻¹)	TR (min)	MÉDIA DE TR (min)	TR RELATIVO (min)
FLUXO 1,0 mL min ⁻¹	20,0	A	14,280	14,276	1,326
		B	14,258		
		C	14,291		
	40,0	A	14,256	14,275	1,561
		B	14,299		
		C	14,271		
FLUXO 1,3 mL min ⁻¹	20,0	A	12,271	12,265	0,685
		B	12,266		
		C	12,259		
	40,0	A	12,259	12,260	0,654
		B	12,255		
		C	12,265		

Tabela 7 - Tempo de retenção, média de tempo de retenção e tempo de retenção relativo para as alterações de gradiente

		CONCENTRAÇÃO (ng mL ⁻¹)	TR (min)	MÉDIA DE TR (min)	TR RELATIVO (min)
GRADIENTE 11%	20,0	A	12,624	12,613	0,337
		B	12,617		
		C	12,598		
	40,0	A	12,621	12,610	0,304
		B	12,610		
		C	12,600		
GRADIENTE 13%	20,0	A	13,157	13,162	0,212
		B	13,176		
		C	13,154		
	40,0	A	13,149	13,176	0,262
		B	13,201		
		C	13,178		

Tabela 8 - Áreas e média das áreas abaixo do pico de IVM com tempo de aquecimento de 30 minutos e 40 minutos

	CONCENTRAÇÃO (ng mL ⁻¹)		TR (min)	ÁREA	MÉDIA DAS ÁREAS
30'	20,0	A	12,953	2463,30	2402,2
		B	12,946	2313,40	
		C	12,952	2430,00	
	40,0	A	12,244	4136,30	4136,9
		B	12,963	4128,60	
		C	12,936	4145,80	
40'	20,0	A	12,931	2348,6	2336,6
		B	12,924	2170,2	
		C	12,912	2491,2	
	40,0	A	12,905	4875,6	4629,2
		B	12,873	4584,6	
		C	12,889	4427,6	

Após a validação dos parâmetros citados acima, o método foi testado com amostras de leite coletadas de vacas tratadas com IVM. Os resultados provam que o método desenvolvido é eficaz na detecção de resíduos de IVM. Apresentados na Tabela 9, esses resultados descrevem as concentrações encontradas nas amostras nos dias 1, 3, 7, 14 e 21 pós-tratamento.

Tabela 9 - Níveis de concentração de IVM encontrados no leite de vacas tratadas com IVM coletado em 1, 3, 7, 14 e 21 dias, após administração, apresentados com média, desvio padrão (DV) e coeficiente de variação (CV)

DIA DE TRATAMENTO		TR (min)	CONCENTRAÇÃO NA CURVA DE CALIBRAÇÃO (ng mL ⁻¹)	MÉDIA ± DP	CV (%)	
VACA 1	1	A	<LD			
		B	-	<LD	-	
		C		<LD		
	3	A	12,969	13,23	13,46 ± 0,88	6,5
		B	12,976	14,45		
		C	12,969	12,72		
	7	A	12,975	11,43	11,21 ± 0,45	4,0
		B	12,954	11,52		
		C	12,953	10,68		
	14	A		<LD		
		B	-	<LD	-	-
		C		<LD		
	21	A		<LD		
		B	-	<LD	-	-
		C		<LD		
VACA 2	1	A	<LQ			
		B	-	<LQ	-	
		C		<LQ		
	3	A	13,534	22,97	22,64 ± 2,38	10,5
		C	13,012	24,86		
		D	13,025	20,12		
	7	A	12,988	18,23	19,02 ± 1,29	6,8
		B	12,969	18,31		
		C	12,974	20,52		
	14	A	12,978	13,05	12,82 ± 0,22	17,5
		C	12,991	12,81		
		E	12,991	12,60		
	21	B		<LD		
		C	-	<LD	-	-
		D		<LD		
VACA 3	1	A	<LQ			
		B	-	<LQ	-	
		C		<LQ		
	3	A		<LD		
		B	-	<LD	-	-
		C		<LD		
	7	A	12,992	10,67	11,67 ± 0,90	7,7
		B	12,968	11,89		
		C	12,969	12,43		
	14	A		<LD		
		B	-	<LD	-	-
		C		<LD		
	21	B		<LD		
		C	-	<LD	-	-
		E		<LD		

<LD: Concentração de IVM abaixo do Limite de Detecção do método.

<LQ: Concentração de IVM abaixo do Limite de Quantificação do método.

- : Não houve cálculo de média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Vários autores relataram a possibilidade de diferentes métodos para extração de múltiplas lactonas macrocíclicas em matrizes biológicas que utilizam a detecção de fluorescência (SCHENCK; LAGMAN, 1999; KOLBERG et al., 2009; CERKVENIK-FLAJS et al., 2010; GIANNETTI et al., 2011; RÜBENSAM et al., 2011; SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ et al., 2012) e, embora este estudo tenha apenas um analito como foco, é possível desenvolver ensaios de múltiplos resíduos envolvendo outras avermectinas. Há relatos de diferentes protocolos de extração. Alguns exigem etapas extras de limpeza com cartuchos de extração de fase sólida (KOLBERG et al., 2009; SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ et al., 2012), enquanto outros possuem uma etapa de precipitação em baixa temperatura (RÜBENSAM et al., 2011), processo que adicionaria 12 horas ao protocolo de extração. Levando-se em consideração esses protocolos, o método desenvolvido neste trabalho é mais rápido e mais prático.

Os parâmetros obtidos de seletividade, linearidade, repetibilidade, recuperação e robustez apresentaram resultados em conformidade com as orientações da ANVISA. No entanto, os valores de CV para precisão intermediária foram acima do valor aceitável ($> 15\%$), podendo ser considerado discrepantes e não desejáveis no que se refere à reprodutibilidade do método. Outro problema encontrado neste parâmetro é a variação entre a concentração injetada e a concentração de acordo com a curva de calibração. Essa falha pôde ser observada no segundo dia de precisão intermediária, realizado pelo Analista B. Recomenda-se repetir esse parâmetro em outro momento de utilização dessa metodologia, aumentando o número de replicatas e dias de procedimento.

Os resultados das amostras de campo coletadas de vacas tratadas com IVM 1,5% estavam acima do LMR. A vaca 1 mostrou concentrações acima do LMR nos dias 3 e 7 após aplicação do medicamento. Após esse período, os níveis sofreram redução, encontrando-se abaixo do LD. A vaca 2 apresentou concentrações maiores que o LMR do dia 3 ao 14 pós-administração, reduzindo após 21 dias. A vaca 3 exibiu valores acima do LMR apenas no dia 7. Dado que a molécula da IVM tem caráter lipofílico, a excreção no leite pode variar, dependendo do percentual de tecido adiposo do animal e do teor de gordura do leite. Esse fator pode explicar a diferença nas concentrações encontradas entre as vacas utilizadas no estudo (RÜBENSAM, 2010). Esses resultados demonstram que o método desenvolvido pode ser utilizado como um teste de triagem, quando os níveis não atingem o LQ e para determinar a concentração quando os níveis estão acima do LQ.

5 CONCLUSÃO

O método desenvolvido oferece uma operação simples de extração líquido-líquido para determinação de IVM em leite bovino. Os parâmetros de linearidade, seletividade, repetibilidade e robustez atenderam aos critérios do guia de validação estabelecido pela ANVISA (ANVISA 2003; ANVISA 2012). Contudo, a precisão intermediária e recuperação precisam ser melhoradas.

REFERÊNCIAS

ANVISA. **Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal - pamvet. relatório 2002/2003: monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo (1º e 2º anos de atividades)**. Brasília - DF: ANVISA, 2005.

ANVISA. **Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal - pamvet. relatório 2004/2005: monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo**. Brasília – DF: ANVISA, 2006.

ANVISA. **Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal - pamvet. relatório 2006/2007: monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo (5º e 6º anos de atividades)**. Brasília - DF: ANVISA, 2009.

AOAC. **Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals**. Rockville, Maryland: AOAC International, 2002.

BRASIL. Instrução Normativa SDA N.º 08, de 30 de março de 2007. **Diário Oficial [da] União**, n. 4 de abril de 2007, p. 8, 2007.

BRASIL. Instrução Normativa SDA N.º 15, de 25 de maio de 2009. **Diário Oficial [da] União**, n. 28 de maio de 2009, p. 8, 2009.

BRASIL. Instrução Normativa SDA N.º 06, de 16 de março de 2010. **Diário Oficial [da] União**, n. 23 de março de 2010, p. 7, 2010.

BRASIL. Instrução Normativa SDA N.º 06, de 25 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial [da] União**, n. 28 de fevereiro de 2011, p. 7, 2011.

BRASIL. Instrução Normativa SDA N.º 07, de 04 de abril de 2012. **Diário Oficial [da] União**, n. 5 de abril de 2012, p. 4, 2012.

BRASIL. Instrução Normativa SDA N.º 07, de 27 de março de 2013. **Diário Oficial [da] União**, n. 3 de abril de 2013, p. 10, 2013.

BRASIL. Portaria SDA N.º 60, de 07 de maio de 2014. **Diário Oficial [da] União**, n. 14 de abril de 2014, p. 11, 2014.

BRASIL. Portaria SDA N.º 22, de 07 de abril de 2015. **Diário Oficial [da] União**, n. 10 de abril de 2015, p. 15, 2015.

CERKVENIK-FLAJS, V.; MILCINSKI, L.; SÜSSINGER, A.; HODOSCEK, L.; DANAHER, M.; ANTONIĆ, J. Trace analysis of endectocides in milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 663, n. 2, p. 165–71, 2010.

COSTA, F. M. da; PEREIRA NETTO, A. D. Desenvolvimento e aplicação de métodos para a determinação de ivermectina em medicamentos de uso veterinário. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 616–622, 2012.

DANAHER, M.; HOWELLS, L. C.; CROOKS, S. R. H.; CERKVENIK-FLAJS, V.; O'KEEFFE, M. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 844, n. 2, p. 175–203, 2006.

DANAHER, M.; RADECK, W.; KOLAR, L.; KEEGAN, J.; CERKVENIK-FLAJS, V. Recent developments in the analysis of avermectin and milbemycin residues in food safety and the environment. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 936–951, 2012.

DEBONIS, K.; PIERRE, J. M. Psychosis, ivermectin toxicity, and “Morgellons disease”. **Psychosomatics**, v. 52, n. 3, p. 295–6, 2011.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia - um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 7, p. 21–25, 1998.

FAO/WHO. Residues of veterinary drugs. In: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 78., Genebra, Suíça. **Anais...** Genebra, Suíça: FAO/WHO, 2014.

FEIJÓ, L. D. et al. Use of Ivermectin in the Brazilian Cattle Industry and its Economical Impacts. In: EURORESIDUE, VII., Egmond Aan Zee, The Netherlands. **Anais...** Egmond Aan Zee, The Netherlands: EURORESIDUE, 2012.

FURLANI, R. P. Z.; DIAS, F. F. G.; NOGUEIRA, P. M.; GOMES, F. M. L.; TFOUNI, S. A. V.; CAMARGO, M. C. R. Occurrence of macrocyclic lactones in milk and yogurt from Brazilian market. **Food Control**, v. 48, p. 43–47, 2015.

GIANNETTI, L.; GIORGI, A.; NECCI, F.; FERRETTI, G.; BUIARELLI, F.; NERI, B. Validation study on avermectine residues in foodstuffs. **Analytica Chimica Acta**, v. 700, n. 1-2, p. 11–5, 2011.

GONZÁLEZ CANGA, A.; SAHAGÚN PRIETO, A. M.; JOSÉ DIEZ LIÉBANA, M.; MARTÍNEZ, N. F.; VEGA, M. S.; VIEITEZ, J. J. G. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. **Veterinary Journal**, v. 179, p. 25–37, 2009.

IBGE. **Indicadores ibge - estatística da produção pecuária**. Junho/2014. ed. Brasília - DF: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2014.

IMPERIALE, F. A.; FARIAS, C.; PIS, A.; SALLOVITZ, J. M.; LIFSCHITZ, A.; LANUSSE, C. Thermal stability of antiparasitic macrocyclic lactones milk residues during industrial processing. **Food Additives & Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, v. 26, n. 1, p. 57–62, 2009.

JESUS, D. A. de. **Determinação de resíduos de avermectinas no leite por clae-em/em**. 2007. Tese (Mestrado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 2007.

- KOLBERG, D. I. S.; PRESTA, M. A.; WICKERT, C.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Rapid and accurate simultaneous determination of abamectin and ivermectin in bovine milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 7, p. 1220–1226, 2009.
- LOBATO, V.; RATH, S.; REYES, F. G. R. Occurrence of ivermectin in bovine milk from the Brazilian retail market. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, p. 668–673, 2006.
- MACDONALD, N.; GLEDHILL, A. Potential impact of ABCB1 (p-glycoprotein) polymorphisms on avermectin toxicity in humans. **Archives of Toxicology**, v. 81, n. 8, p. 553–63, 2007.
- MOLINARI, G.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. New ventures in the genotoxic and cytotoxic effects of macrocyclic lactones, abamectin and ivermectin. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 128, n. 1-3, p. 37–45, 2010.
- PRABHU, S. V.; WEHNER, T. A.; TWAY, P. C. Determination of ivermectin levels in swine tissues at the parts per billion level by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 1468–1471, 1991.
- RÜBENSAM, G. **Determinação dos resíduos de avermectinas e milbemicinas em leite bovino por cromatografia líquida e detecção por fluorescência e espectrometria de massas**. 2010. Tese (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul., Porto Alegre - RS, 2010.
- RÜBENSAM, G.; BARRETO, F.; HOFF, R. B.; KIST, T. L.; PIZZOLATO, T. M. A liquid-liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 705, n. 1-2, p. 24–9, 2011.
- SANTOS, P. S. **Caracterização físico-química e determinação de resíduos farmacológicos (albendazole e ivermectina) em leite de cabras nativas criadas na caatinga**. 2013. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, Itapeninga, BA, 2013.
- SCHENCK, F. J.; LAGMAN, L. H. Multiresidue determination of Abamectin, doramectin, ivermectin, and moxidectin in milk using liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of AOAC International**, v. 82, p. 1340–1344, 1999.
- SKOOG, D.; HOLLER, F.; NIEMAN, T. **Princípios de análise instrumental**. [s.l.] BOOKMAN COMPANHIA ED, 2009.
- SOUZA, S. V. C.; SILVA, G.; DINIZ, M. H. G. M.; SANTOS, E. V.; LIMA, J. A.; TEODORO, J. C. Determinação de Resíduos de Avermectinas em Fígado Bovino Por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Ciência e Tecnologia de Alimentos (Campinas)**, v. 23, n. 1, p. 54–58, 2003.
- SOUZA, U. A. **Resíduos de lactonas macrocíclicas no leite bovino**. 2013. Tese (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2013.

STONG, J. D. Determination of ivermectin by fluorescence derivatization. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 266–270, 1987.

SUNG, Y.-F.; HUANG, C.-T.; FAN, C.-K.; LIN, C.-H.; LIN, S.-P. Avermectin intoxication with coma, myoclonus, and polyneuropathy. **Clinical Toxicology**, v. 47, n. 7, p. 686–8, 2009.

SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T.; JEDZINIAK, P.; OLEJNIK, M.; ŻMUDZKI, J. Control of residues of five macrocyclic lactones in cow milk by liquid chromatography with fluorescence detection. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 56, n. 4, p. 595–599, 2012.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. MICROEXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA. **Quimica Nova**, v. 23, n. 4, p. 523–530, 2000.