



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS QUÍMICA E  
BIOLÓGICA  
LABORATÓRIO DE QUÍMICA ANALÍTICA E AMBIENTAL

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Naamã Elias Augusto Alves**

**Orientador:** Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza

**Brasília-DF**

**2014**

**Naamã Elias Augusto Alves**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA  
DETERMINAÇÃO DE IVERMECTINA EM AMOSTRAS DE LEITE**

*Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica do Instituto de Química da Universidade de Brasília, na Área de concentração de Tecnologia Química como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologias Química e Biológica.*

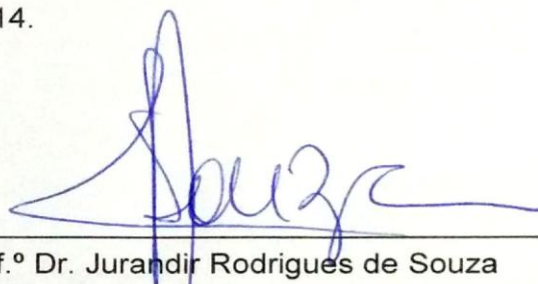
**Orientador:** Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza

**Brasília-DF**

**2014**

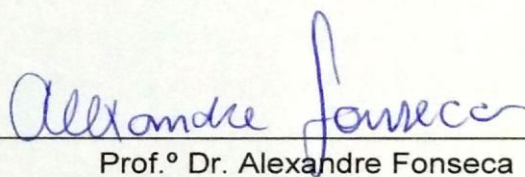
## Comunicado

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Naamã Elias Augusto Alves**, intitulada **“OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE IVERMECTINA EM AMOSTRAS DE LEITE”**, apresentada no Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 08 de agosto de 2014.



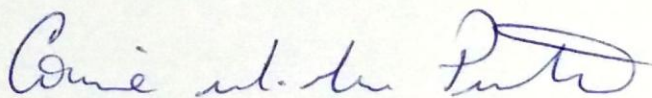
---

Prof.º Dr. Jurandir Rodrigues de Souza  
Presidente (IQ / UnB)



---

Prof.º Dr. Alexandre Fonseca  
Membro titular (IQ / UnB)



---

Profa.º Dra. Concepta Margaret McManus Pimentel  
Membro titular (IB /UnB)

Brasília, 9 de Setembro de 2014

Dedico esta dissertação a todos os meus familiares e colegas, que sempre me apoiaram e me deram força para realizar esse sonho.

## **Agradecimentos**

A Deus, por ter me concedido forças para concluir esse mestrado, concluindo uma importante fase da minha vida, onde tenho plena convicção de que sem a ajuda d'Ele não seria possível.

À minha família, por estar sempre ao meu lado me apoiando e me incentivando a seguir em frente, a minha esposa Pollyana da Silva Teles Alves, que durante todo o tempo esteve ao meu lado suportando todas as conquistas e decepções durante esse período, aos meus pais, Délia Elias Pereira Alves e Amilton Augusto Alves, por todo o investimento e incentivo aos estudos, e por valores morais ensinados durante toda a vida.

Ao meu orientador Jurandir Rodrigues de Souza, por ter aceito me dar orientação e apoio nessa corrida, onde cresci muito em conhecimento científico, mas principalmente como pessoa, tendo uma nova visão do papel de nossa profissão, não de forma individualista mas em todo o contexto de uma sociedade saudável.

Aos meus colegas do laboratório LQAA, que em todos os momentos estiveram presentes se colocando a disposição para auxiliar onde fosse possível, principalmente à Fabíula que me ajudou muito no trato com os equipamentos, ao Gustavo pelas horas de distração e conversa, à Rosana por todas as histórias compartilhadas. Aos meus amigos irmãos Frederico, Gabriela, e Haline que estiveram presentes desde o início da graduação, e a todos os demais que contribuíram e não foram citados.

À minha colega Elisangela e toda a sua família, por ter disponibilizado hospedagem tão carinhosa e local de coleta particular.

À CAPES pelo apoio financeiro prestado.

## RESUMO

O fármaco veterinário endectocida conhecido como ivermectina ou 22,23-dihidroavermectina B<sub>1a</sub> + 22,23-dihidroavermectina B<sub>1b</sub>, apesar da sua recente proibição, continua a ser usado largamente no Brasil tanto em bovinos como em suíno e bubalino, porém a grande maioria se deve aos bovinos, devido ao fato do Brasil possuir o segundo maior rebanho mundial. A problemática da utilização deste fármaco está associada a uma possível excreção da ivermectina no leite desses animais, o qual é amplamente utilizado na dieta diária dos brasileiros, e os efeitos devido à exposição crônica a esse fármaco ainda não são bem estudados. Este trabalho adaptou uma metodologia para determinação da ivermectina em leite de bovinos. Foi realizada a validação da metodologia com leitura de amostra de leite fortificada. A amostra de leite integral foi coletada direto do animal para que permanecesse a quantidade total de gordura, devido ao caráter lipofílico do fármaco. O método validado baseou-se em cromatografia líquida com detecção UV/VIS. A extração foi realizada em duas partes, a primeira líquido-líquido, onde há a separação das gorduras e proteínas, e a segunda em fase sólida com o auxílio de cartuchos SPE C18. Para a leitura das amostras utilizou-se cromatógrafo líquido, com detector de UV-Vis, com coluna Phenomenex C18, 10cm, ID 46µm. Os resultados de validação mostraram que o método é linear, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual à 0,991, seletivo, preciso, com coeficientes de variação entre 3,98 e 9,42%, exato, com valores de recuperação variando entre 98 e 110% e com limites de detecção e quantificação de 19,825 µg/L e 49,350 µg/L respectivamente.

**Palavras-chave:** endectocidas, ivermectina, leite, parasiticidas.

## Abstract

The veterinary drug called ivermectin or endectocide 22.23-22.23-dihydroavermectin B1a + B1b dihydroavermectin, despite its recent ban, continues to be used widely in Brazil both in cattle and in pigs and buffalo, but the vast majority is due to cattle, due to the fact that Brazil has the second largest herd. The issue of use of this drug is associated with a possible excretion of ivermectin in milk of these animals, which is widely used in daily diet of Brazilians, and the effects due to chronic exposure to this drug are not well studied. This study adapted a method for determining the milk of bovine ivermectin. Validate the methodology with sample reading of fortified milk was performed. The sample of whole milk was collected directly from the animal to remain on the total amount of fat, due to the lipophilic nature of the drug. The validated method was based on liquid chromatography with UV detection / VIS. The extraction was performed in two parts, the first liquid-liquid, where there is a separation of fat and protein, and the second solid phase with the aid of C18 SPE cartridges. To read the samples we used liquid chromatography with UV-Vis detector with Phenomenex C18, 10cm, 46µm ID column. The validation results showed that the method is linear, with a coefficient of determination (R<sup>2</sup>) equal to 0.991, selective, precise, with coefficients of variation between 3.98 and 9.42%, exact, with recovery values ranging between 98 and 110% limits of detection and quantification of 19,825 mg / L and 49,350 mg / l respectively.

**Keywords:** endectocides, ivermectin, milk, fungicidal

## Sumário

<b>Folha de rosto</b> .....	ii
<b>Folha de aprovação</b> .....	iii
<b>Dedicatória</b> .....	iv
<b>Agradecimentos</b> .....	v
<b>Resumo</b> .....	vi
<b>Abstract</b> .....	vii
<b>Sumário</b> .....	viii
<b>Lista de figuras</b> .....	xi
<b>Lista de tabelas</b> .....	xii
<b>Lista de abreviaturas e acrônimos</b> .....	xiii
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b>	
1.1 – Introdução .....	01
1.2 – Objetivos.....	02
1.2.1- <i>Objetivos Específicos</i> .....	02
<b>CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
2.1 – Medicamentos veterinários.....	03
2.2 – Tipos de medicamentos veterinários.....	04
2.3 – As avermectinas.....	05
2.3.1 – <i>A ivermectina</i> .....	06
2.4 – O mercado brasileiro dos medicamentos veterinários.....	07
2.5 – Ações de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em âmbito nacional.....	08
2.6 – Proibição do uso das lactonas macrocíclicas pelo ministério da agricultura.....	09
2.7 – Metodologias de análise de resíduos de medicamentos veterinários em matrizes de origem animal.....	10
2.8 – Limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários em leite.....	11
2.9 – Validação de métodos analíticos.....	12
2.9.1- <i>Seletividade</i> .....	12
2.9.2- <i>Linearidade e sensibilidade</i> .....	13



2.9.3- Limite de detecção e limite de quantificação.....	14
2.9.4- Exatidão ou Recuperação.....	15
2.9.5- Precisão.....	16
<b>CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
3.1- Lavagem de Vidraria.....	19
3.2- Amostragem.....	19
3.3- Determinação por cromatografia.....	20
3.4- Extração.....	21
3.4.1- Sequência de extração.....	21
3.5 – Validação do método.....	22
3.5.1- Seletividade.....	22
3.5.2- Linearidade e sensibilidade.....	22
3.5.3- Recuperação.....	22
3.5.4- Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	23
3.5.5- Precisão.....	23
3.6 – Tratamento estatístico.....	23
3.7 – Otimização cromatográfica.....	24
3.7.1 – Fase móvel.....	24
3.7.2 – Comprimento de onda.....	25
3.7.3- Coluna.....	25
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
4.1 – Otimização da metodologia.....	26
4.1.1- Determinação do comprimento de onda.....	27
4.1.2- Determinação da fase móvel.....	28
4.1.3- Determinação do tempo de corrida e fluxo.....	29
4.2 – Validação da Metodologia.....	30
4.2.1- Seletividade.....	30
4.2.2- Linearidade e sensibilidade.....	32
4.2.3- Limite de Detecção e Quantificação.....	33
4.2.4- Exatidão ou Recuperação.....	34
4.2.5- Precisão.....	36
4.3 – Teste da metodologia em amostra fortificada.....	36
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>

<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....</b>	<b>40</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Homólogos que compõem a ivermectina, adaptada.

**Figura 2.** Faturamento da Indústria de Produtos para a Saúde Animal entre os anos de 2008 e 2013.

**Figura 3.** Cromatógrafo Líquido com detecção UV/Vis – Varian 920 – LC.

**Figura 4.** Sequencia de extração da Ivermectina na Amostra.

**Figura 5.** Espectros da ivermectina nas concentrações 10, 20, 30, 40 e 50 mg/L na faixa de 200 a 300 nm.

**Figura 6.** Cromatograma da solução padrão de ivermectina em metanol HPLC na concentração de 1000 µg/L com a fase móvel acetonitrila e água (70:30) (a), metanol, acetonitrila e água (65:30:5) (b), e metanol e água (80:20) (c), tempo de retenção 5 minutos, comprimento de onda 245 nm e fluxo de 0,7 mL/min.

**Figura 7.** Cromatograma da solução padrão de ivermectina em metanol HPLC na concentração de 1000 µg/L com a fase móvel metanol, acetonitrila e água (65:30:5), tempo de retenção 3 minutos, comprimento de onda 245 nm e fluxo de 1,0 mL/min.

**Figura 8.** Cromatogramas de amostra fortificada com padrão de ivermectina (A) e cromatograma de amostra branca, sem a presença do analito (B).

**Figura 9.** Curva analítica utilizada na validação da metodologia com concentração variando de 50 a 450 µg/L.

**Figura 10.** Cromatograma de amostra branca utilizado no cálculo dos LQ e LD. A linha representa a faixa que foi integrado.

**Figura 11.** Cromatogramas referentes a amostras fortificadas para o teste de recuperação, nas concentrações de 50, 200 e 400 µg/L.

**Figura 12.** Cromatogramas de amostras fortificadas, com 100 µg/L (A) e 250 µg/L (B)

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Evolução do Faturamento da Indústria de Saúde Animal no Brasil.

**Tabela 2.** Valores de Limites de Detecção e Quantificação para os detectores de Massas e Fluorescência.

**Tabela 3.** Limites Máximos de Resíduos de avermectinas em leite (PAMVET).

**Tabela 4.** Metodologias de cálculos de Limite de Detecção (Adaptado, INMETRO, 2011).

**Tabela 5.** Metodologias de cálculos de Limite de Quantificação (Adaptado, INMETRO, 2011).

**Tabela 6.** Parâmetros cromatográficos otimizados para cromatógrafo Líquido com detecção por UV-Vis para determinação da 22,23 dihidroavermectina.

**Tabela 7.** Valores calculados dos testes F e T com 95% de confiança n=7.

**Tabela 8.** Limites de Detecção e Quantificação

**Tabela 9.** Valores de recuperação nos níveis de concentração de 50, 200, 400 µg/L.

**Tabela 10.** Coeficiente de variação para análise da precisão e exatidão.

**Tabela 11.** Médias das leituras nas concentrações de 100 e 250 µg/L, média das leituras, concentração estimada, desvio padrão e os valores dos coeficientes de variação.

## LISTA DE ABREVEATURAS E ACRÔNIMOS

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**C18** – Octadecilsilano

**CV** – Coeficiente de Variação

**EM** – Espectrômetro de Massas

**INMETRO** – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

**LD** – Limite de Detecção

**LQ** – Limite de Quantificação

**LQAA** – Laboratório de Química Analítica e Ambiental

**MRV** – Materiais de Referência Certificados

**UV/VIS** – Detector Ultravioleta/Visível

**LMR** – Limite Máximo de Resíduo

**PNCRC** – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

**PAMVET** – Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal

**MAPA** – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

# 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

## 1.1 Introdução

A bovinocultura é muito importante no Brasil, sendo considerada um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. A população de bovinos no Brasil, em 2012, chegava a 185.836.144 cabeças, alcançando a segunda posição dentre os países. No Brasil têm-se duas vertentes quando se fala em bovinocultura, as cadeias produtivas da carne e as cadeias produtivas do leite, tornando-se um dos principais fornecedores mundiais desse tipo de alimento<sup>1,2</sup>.

A demanda por esses alimentos é cada vez maior, devido ao seu alto valor biológico. Dessa forma tornou-se necessário um aumento na eficiência da produção desses animais, tornando o número de infecções, ectoparasitoses e verminoses uma preocupação. A utilização de drogas preventivas e terapêuticas tornou-se de fundamental importância para o controle de enfermidades que prejudicavam a qualidade do produto final. Essa utilização desenfreada causa um fenômeno denominado resistência. Esse fenômeno faz com que conforme se aumenta a utilização (dosagem) dos fármacos nos animais os parasitas se tornam cada vez mais resistentes aos fármacos, aumentando a dose necessária para o controle dos parasitas, isso ocorre devido ao fato de após a aplicação dos fármacos uma pequena parcela mais resistente dos parasitas sobrevivem e são esses que irão se reproduzir e contaminar outros animais.<sup>3</sup> Assim, fármacos veterinários são produzidos largamente para suprir essa demanda do mercado.<sup>4</sup> O mercado de fármacos veterinários no Brasil está dividido em nove classes de produtos: biológicos, antimicrobianos, ectoparasiticidas, endectocidas, endoparasiticidas, terapêuticos, tônicos/fortificantes, desinfetantes, dermatológicos e uma classe que denomina-se outros.<sup>5</sup>

Dentre as classes de produtos apresentadas as que se destacam no manejo de ruminantes são os antimicrobianos, parasiticidas (endoparasiticidas, ectoparasiticidas, endectocidas) e desinfetantes, sendo que os parasiticidas participam com 28% do total do mercado de saúde animal.<sup>4,5</sup>

Os parasiticidas mais utilizados são as lactonas macrocíclicas, que surgem em 1975, fazem parte da classe dos endectocidas e se subdividem em dois grupos denominados avermectinas e milbemicinas. O grupo das avermectinas se destacou

com a síntese da ivermectina a partir da abamectina, que já era utilizada como parasiticida e inceticida, o que deu origem a um fármaco endectocida ainda mais eficiente, o qual foi o primeiro a ser comercializado.<sup>6</sup>

Apesar da utilização da ivermectina em doses recomendadas não causar danos à saúde humana e manter a segurança da cadeia alimentar, a demanda de consumo desses fármacos deve ser monitorada nos alimentos de origem animal, principalmente nos alimentos que estão incluídos na dieta diária, como é o caso do leite. As avermectinas são substâncias altamente lipofílicas, o que faz com que as moléculas desse fármaco sejam divididas por todo o corpo do animal, independente da forma de administração, principalmente no tecido adiposo, o que a torna facilmente excretada pelo leite.<sup>7,8</sup>

A toxicidade das avermectinas em humanos ainda não foi estudada, porém em bovinos a administração de altas doses de ivermectina pode induzir neurotoxicidade e alteração fetal.

## 1.2 Objetivos

O objetivo desse trabalho foi otimizar uma metodologia para quantificar o fármaco veterinário, ivermectina, em leite de bovinos.

### 1.2.1 Objetivos específicos

- Otimizar a metodologia analítica baseada em cromatografia líquida acoplada a detector de UV/VIS, com relação aos parâmetros de fluxo, comprimento de onda, fase móvel e coluna;
- Validar a metodologia analítica otimizada para a detecção de ivermectina em leite bovino;
- Alcançar como Limite de Quantificação, o valor de Limite Máximo de Resíduos descrito no PANVET, de 10 µg/L para o analito;

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A produção de leite no Brasil se deve a alta demanda pelo alimento que é um dos mais consumidos em todo o mundo. Só no Brasil, o consumo de leite líquido per capita é em média 38 kg por ano, segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares de 2002/2003 realizada pelo IBGE.<sup>9</sup> Além disso, a recomendação de consumo desse alimento, ordenado pelo grupo de laticínios e derivados, segundo o Guia Alimentar para a População Brasileira, é de 3 porções por dia, o equivalente a 600 mL, em média, de leite.<sup>10</sup>

Porém como o leite é um alimento obtido da secreção da glândula mamária das vacas, por processos hormonais, que se constitui de substâncias que são sintetizados pelas células secretoras do tecido glandular mamário, e outros substâncias que são agregadas pelo epitélio glandular e pelo próprio sangue<sup>11</sup>, ele pode conter uma série de componentes que não são propriamente ditos originários da glândula mamária, e sim de agregados do sangue, como por exemplo, resíduos de medicamentos de uso veterinário utilizados para tratamento do rebanho.

### 2.1 Medicamentos Veterinários

Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os medicamentos veterinários são toda e qualquer substância aplicada em qualquer animal destinado à produção de alimentos com fins terapêuticos, profiláticos, de diagnóstico, ou para modificar as funções fisiológicas, de comportamento ou como promotor de crescimento.<sup>12</sup>

De acordo com a legislação brasileira, Lei nº 12.689 de 19 de Julho de 2012, os medicamentos para tratamento animal são divididos em três classes: Medicamento de Referência, Medicamento Similar e Medicamento Genérico. O medicamento de Referência é:

“medicamento veterinário inovador registrado no órgão federal competente e comercializado no País, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente nesse órgão, por ocasião do registro”.

O medicamento Similar é:



“medicamento de uso veterinário que contém o mesmo princípio ativo do medicamento de referência de uso veterinário registrado no órgão federal competente, com a mesma concentração e forma farmacêutica, mas cujos excipientes podem ou não ser idênticos, devendo atender às mesmas especificações das farmacopeias autorizadas e aos padrões de qualidade pertinentes e sempre ser identificado por nome comercial ou marca”.

E o medicamento genérico é:

“medicamento que contém os mesmos princípios ativos do medicamento de referência de uso veterinário, com a mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, podendo ser com este intercambiável, permitindo-se diferir apenas em características relativas ao tamanho, formato, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos do produto, geralmente produzido após a expiração ou a renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada suas bioequivalência, eficácia e segurança por meio de estudos farmacêuticos, devendo sempre ser designado pela Denominação Comum Brasileira - DCB ou, na sua ausência, pela Denominação Comum Internacional – DCI”.<sup>13</sup>

## **2.2 Tipos de Medicamentos Veterinários**

De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (Sidan), os grupos de medicamentos dispostos no mercado são denominados biológicos, antimicrobianos, ectoparasiticidas, endotocidas,

endoparasiticidas, terapêuticos, tônicos fortificantes, desinfetante, dermatológicos e outros.<sup>5</sup>

Os medicamentos biológicos são aqueles obtidos a partir de organismos vivos ou derivados destes, como as vacinas, soros, antitoxinas e antígenos. São utilizados para tratamento de viroses e bacterioses.

Os medicamentos antimicrobianos são substâncias que destroem ou inibem o crescimento de microrganismos, e esses medicamentos são divididos em dois subgrupos, os quimioterápicos, quando são fabricados de forma sintética, e os antibióticos, quando são fabricados através dos próprios microrganismos.

Os medicamentos ectoparasiticidas são substâncias utilizadas para tratamento de infecções por moscas, pulgas, carrapatos, dentre outros ectoparasitas.

Os medicamentos endotocidas são substâncias capazes de tratar tanto ectoparasitas quanto endoparasitas, ou seja, têm dupla ação, pois em casos de focos de resistência, ele é o mais indicado e utilizado.

Os medicamentos terapêuticos são substâncias utilizadas para prevenir algum quadro patológico, para tratamento hormonal (endócrino), quadros inflamatórios, entre outros. Nessa classe estão os hormônios sintéticos ou naturais, antiinflamatórios e analgésicos.

Os tônicos / fortificantes são substâncias utilizadas para reestruturar e reestabelecer a saúde integral do animal. Os desinfetantes são substâncias utilizadas para desinfecção de ferimentos nos animais, além da desinfecção e higienização de instalações e equipamentos de criação dos animais; nessa classe estão os antissépticos.

Os medicamentos dermatológicos são substâncias utilizadas para prevenção e tratamento de doenças da pele do animal.

Na classe denominada “outros”, encontram-se os embelezadores e os suplementos nutricionais para animais.

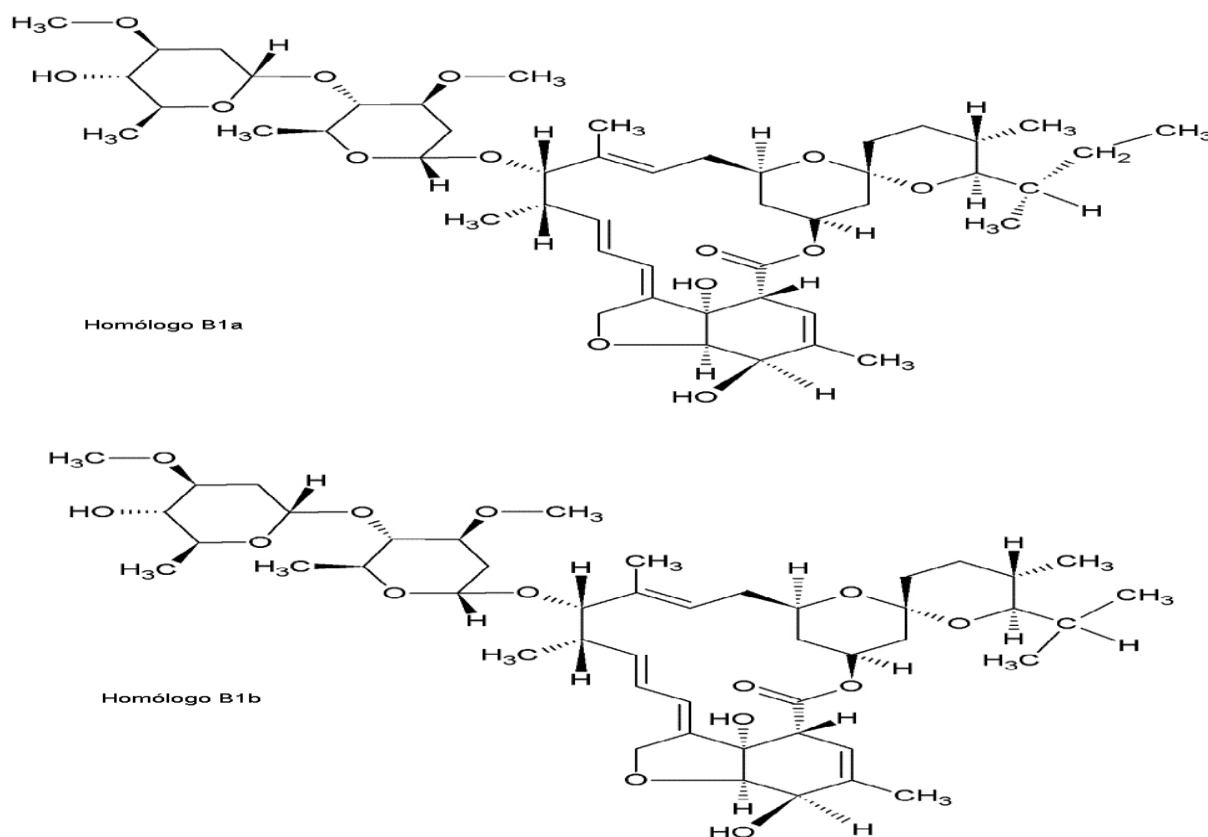
## 2.3 As avermectinas

As avermectinas são um grupo de lactonas macrocíclicas composto por Ivermectina, Abamectina, Doramectina, Eprinomectina e Selamectina ou Emamectina<sup>1,7,8,14,15</sup> que são sintetizadas através da fermentação da bactéria gram-

positiva *Streptomyces avermitilis*, encontrada comumente em solos.<sup>8,16</sup> Possuem propriedades endoectocidas, que combatem um amplo grupo de endoparasitas e ectoparasitas<sup>8</sup>, por isso são medicamentos utilizados pela terapêutica veterinária e humana no tratamento de parasitas vertebrados e invertebrados.

### 2.3.1 Ivermectina

A ivermectina, também conhecida como 22,23-diidroavermectina B1<sup>2,14,17</sup>, é um composto químico obtido através da hidrogenação seletiva da avermectina B1 (entre a ligação C-22 e C-23)<sup>8,14,15,18</sup> em que sua fórmula constitui uma mistura de homólogos, onde 80% do homólogo B1a (5-O-dimetil-22,23-di-hidroavermectina A1a) que possui massa molecular de 875,1 g/mol e fórmula molecular  $C_{48}H_{74}O_{14}$  e 20% do homólogo B1b (5-O-dimetil-25-(1-metilpropil)-22,23-di-hidro-25-(1-metil-etil)avermectina A1a) que possui massa molecular de 861,07 g/mol e fórmula molecular de  $C_{47}H_{72}O_{14}$ .<sup>1,5,6,14,15,19</sup>



**Figura1.** Homólogos que compõem a ivermectina adaptada.<sup>4</sup>

É utilizada, tradicionalmente desde 1981, atingindo um largo espectro de micro-organismos patógenos-parasitas. Ela é rapidamente absorvida, independente

da forma de administração<sup>5,20</sup>. Segundo alguns autores, a sua ação depende da via de administração, formulação, espécie animal a ser tratada e condição corpórea<sup>1,5,17</sup>. Ela atua nos neurotransmissores glutamato de invertebrados e no ácido gama-aminobutírico (GABA) de alguns invertebrados e vertebrados, causando aumento do fluxo de íons na membrana celular, polarizando-as, causando assim uma paralisação muscular e conseqüentemente a morte.<sup>6,7,8,14,18,19,20</sup>

## 2.4 O mercado brasileiro dos medicamentos veterinários

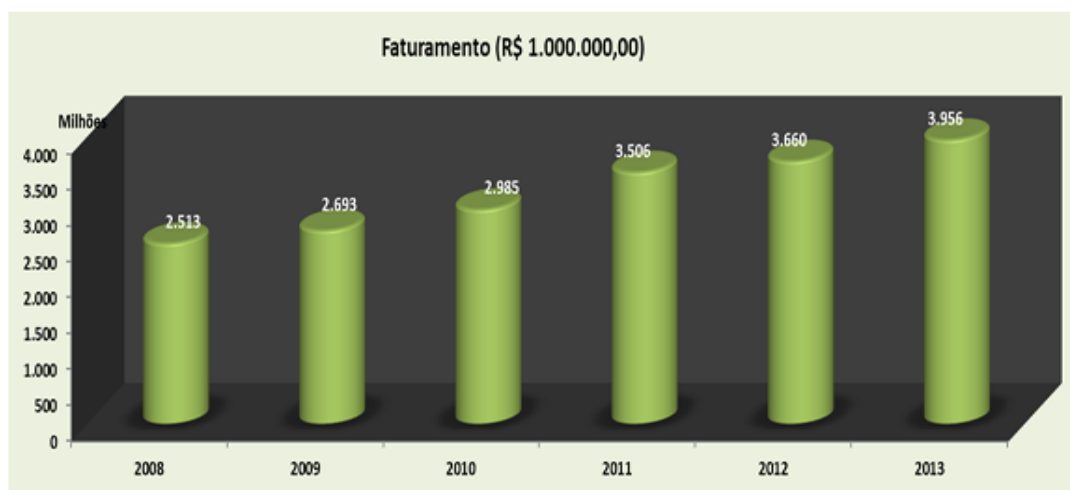
O mercado brasileiro para esses medicamentos veterinários vêm aumentando a cada dia, uma vez que a preocupação dos produtores sobre a saúde e bem estar do animal está cada vez maior. Além disso, os fatores como exportação de produtos veterinários e a maior fiscalização sanitária com critérios mais rigorosos de comercialização desses produtos, também são bem influentes na variação do mercado brasileiro para os produtos veterinários<sup>5</sup>. Esse aumento do mercado deve-se também a resistência que os micro-organismos patógenos criam depois da exposição ao medicamento, dessa forma, torna-se necessário a utilização de doses cada vez maiores do medicamento para assegurar a sua eficácia, de forma que gera um aumento do consumo.<sup>3</sup>

Entre os anos de 2000 e 2006 o faturamento da indústria de produtos para saúde animal teve um crescimento nominal de 72%, de acordo com os dados colhidos pelo Sidan<sup>5</sup>, como mostra o Tabela 1.

**Tabela 1.** Evolução do Faturamento da Indústria de Saúde Animal no Brasil (SINDAN)

<b>Ano</b>	<b>RS Bilhões</b>	<b>Variação anual (%)</b>	<b>US\$ Milhões</b>
<b>2000</b>	1.413,00	—	771,5
<b>2001</b>	1.502,50	6,3	636,6
<b>2002</b>	1.713,70	14,1	596,3
<b>2003</b>	1.869,20	9,1	614,1
<b>2004</b>	2.058,20	10,1	706,5
<b>2005</b>	2.210,80	7,4	917,5
<b>2006</b>	2.365,60	7	1.071,20

Entre os anos de 2008 e 2013, o faturamento da indústria de produtos para a saúde animal teve um crescimento de 57,5%, de acordo com os dados colhidos pelo Sindan<sup>21</sup>, como mostra a Figura 2.



Fonte: Coinf

**Figura 2.** Faturamento da Indústria de Produtos para a Saúde Animal entre os anos de 2008 e 2013.

Segundo estudo realizado por Netto et al, 2005, os medicamentos mais utilizados para tratamento de rebanhos, na região sul do país (Paraná), são os antibióticos e os antiparasitários, tanto internos quanto externos, que representaram 78,51% dos medicamentos utilizados pelos produtores. As avermectinas representam um total de 29,62% dos antiparasitários utilizados pelos produtores.<sup>22</sup>

Como os medicamentos veterinários podem deixar resíduos nos produtos destinados à alimentação humana, esses podem causar danos à saúde, provocando efeitos carcinogênicos, genotóxicos, endócrinos, entre outros.<sup>23, 24</sup> A determinação desses resíduos se faz de grande importância, uma vez que órgãos de fiscalização internacional e nacional estabelecem limites máximos de resíduos que podem conter nos produtos destinados à alimentação humana, sempre pensando na segurança alimentar, pois quantidades maiores que esses limites impostos podem causar disfunções hepáticas, digestivas, cardíacas, alergias, além da bioacumulação no ambiente.<sup>24</sup>

## 2.5 Ações de Monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em âmbito nacional

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes Animal (PNCRC) é uma ferramenta de gerenciamento de risco com o objetivo de promover a garantia de qualidade do sistema de produção de alimentos de origem animal. Esse plano possui interfaces de monitoramento, investigação e exploração dos produtos de origem animal destinados à alimentação humana. Além disso, utiliza-se de metodologias credenciadas pelo Inmetro, uma vez que os laboratórios responsáveis pelas análises precisam estar cadastrados no Inmetro, validando os resultados.<sup>25</sup> Essa ferramenta é realizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

O Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários (PAMVet) em alimentos de origem animal foi desenvolvido pela ANVISA com o objetivo de controlar e fiscalizar os resíduos de medicamentos veterinários em alimentos para consumo humano, conforme a Lei nº 9.782 de 26 de Janeiro de 1999.<sup>26</sup> Esse programa surgiu para complementar o programa já existente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o PNCRC. As análises feitas em produtos, já disponibilizados no comércio, permitem monitorar a ocorrência dos resíduos de medicamentos em leite, além das práticas de produção e do risco de exposição a esses resíduos. Os resultados encontrados permitem a atuação, a adoção e a recomendação de medidas preventivas em âmbito nacional.<sup>12</sup>

## **2.6 Proibição do uso das lactonas macrocíclicas pelo Ministério da Agricultura.**

Recentemente, o Ministério da Agricultura (MAPA), através da instrução normativa nº13 de 29/05/2014, proibiu a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso de produtos antiparasitários de longa ação que contenham como princípios ativos as lactonas macrocíclicas (avermectinas) para uso veterinário e suscetíveis de emprego na alimentação de todos os animais e insetos.<sup>27</sup>

A proibição deve ser mantida de acordo com o MAPA até que sejam realizados estudos a respeito da eficácia do medicamento e animais e possíveis efeitos contaminantes.<sup>27</sup>

O Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde animal (SIDAN) repudia o teor da instrução normativa publicada pelo MAPA, uma vez que estes

produtos são reconhecidos como uma ferramenta indispensável para o controle de ecto e endoparasitas que causam grandes prejuízos à pecuária nacional. Além disso, as lactonas macrocíclicas são essenciais à produtividade e competitividade no mercado local e global de carnes.<sup>22</sup>

## **2.7 Metodologias de análise de resíduos de medicamentos veterinários em matrizes de origem animal**

Revisões e estudos do estado da arte para metodologias de determinação desses resíduos de medicamentos veterinários vêm sendo desenvolvidos com o intuito de monitorar de forma mais palpável as quantidades existentes em matrizes de origem animal. Porém como não há uma metodologia definida, as metodologias descritas na literatura nem sempre possuem condições ideais, como a rapidez, a confiabilidade, a seletividade e a detectabilidade aceitáveis.<sup>24</sup>

De acordo com revisões de literatura a metodologia comumente utilizada para análise de medicamentos veterinários em matrizes de origem animal é a cromatografia líquida com diferentes detectores. Os detectores de fluorescência e massas são os mais utilizados devido a sua alta sensibilidade e especificidade para os analitos. Devido as matrizes de origem animal serem extremamente complexas, a utilização de detectores sensíveis e específicos é de fundamental importância. Sendo a estrutura química das lactonas macrocíclicas uma rede de cadeias carbônicas levemente polar, devido a presença de grupos hidroxilas e funções éster, a coluna cromatográfica C18 de fase reversa é utilizada em 100% dos artigos revisados que realizavam quantificação de avermectinas em matrizes de origem animal. O preparo de amostra segue, sempre, um padrão, onde primeiramente se faz a extração com o auxílio de solventes onde retira-se a ivermectina com diversos contaminantes e após realiza-se a purificação com o auxílio da extração em fase sólida utilizando-se cartuchos tipo SPE.

Os resíduos das lactonas macrocíclicas, avermectinas, no leite é determinado em sua grande maioria pela técnica de cromatografia acoplada a detector de fluorescência, os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados são respectivamente 366 e 426nm. Nesse detector torna-se necessária o acréscimo de uma etapa no preparo de amostra, onde depois de extraídas as lactonas macrocíclicas é necessário uma etapa de derivatização, que consiste na

aromatização de parte das moléculas para torna-las sensíveis ao detector de fluorescência, o que agrega erros sistemáticos e aleatórios a metodologia.<sup>15</sup>

Mais recentemente, a técnica de detecção por massas, em suas diversas variáveis, vem sendo implementadas, porém é uma técnica relativamente cara e de difícil manuseio, devido ao rigoroso controle, que se deve ter, de seus parâmetros. Entretanto, figuras de mérito como seletividade analítica, são facilmente observáveis, e apresenta a melhor sensibilidade.<sup>7</sup>

A técnica de detecção por UV-Vis não foi encontrada para detecção de traços, sendo amplamente utilizada como forma de quantificar as lactonas macrocíclicas em análises de componente principal. No caso dos medicamentos, tanto injetável como comprimidos ou cápsulas, essa técnica é largamente utilizada.<sup>4</sup>

A Tabela 2 mostra os valores dos limites de detecção e quantificação dos detectores de massas e fluorescência, pode-se observar a soberania da técnica de massas frente à de fluorescência.

**Tabela 2.** Valores de limites de detecção e quantificação para os detectores de massas e fluorescência.

<b>Detector</b>	<b>Limite de Detecção (µg/L)</b>	<b>Limite de Quantificação (µg/L)</b>
<b>Massas</b> <sup>28</sup>	0,05	0,2
<b>Fluorescência</b> <sup>29</sup>	5	10

## **2.8 Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Leite**

O limite máximo de resíduo é a concentração máxima de uma substância, resultante da utilização de medicamento veterinário, que é aceito pelos órgãos fiscalizadores no alimento, expresso em unidades de concentração.<sup>30</sup>

As referências para os Limites Máximos de Resíduos estão compreendidas no Codex Alimentarius, no Mercosul (pela Resolução GMC nº 54 de 2000) e União Européia, e os órgãos fiscalizadores do Brasil as utilizam para monitorar a qualidade dos produtos de origem animal e vegetal.

Os Limites Máximos de Resíduos de medicamentos veterinários dos tipos antimicrobianos e antiparasitários em leite estão descritos na Tabela 3, retirada do Relatório dos anos 2006 e 2007 do PAMVet.<sup>30</sup>



**Tabela 3.** Limites Máximos de Resíduos de avermectinas em Leite (PAMVET)

<b>Grupo</b>	<b>Substância Farmacologicamente ativa</b>	<b>LMR (ug/L)</b>	<b>Referência</b>
<b>Avermectinas</b>	Abamectina	5	Codex
	Doramectina	15	Codex
	Ivermectina	10	Codex

## 2.9 Validação de métodos analíticos

### 2.9.1 Seletividade

A presença de outros compostos orgânicos com características semelhantes às encontradas na ivermectina, podem interferir positivamente, aumentando o sinal analítico, ou negativamente, diminuindo o sinal analítico, nas medidas e a intensidade dessa interferência depende da concentração.<sup>31</sup> A seletividade de um método analítico define se um método é ou não afetado pela presença de interferentes, que podem ser outros compostos ativos, excipientes, impurezas e produtos de degradação. Em outras palavras, seletividade é o grau de interferência que um composto tem frente a outros compostos, a capacidade de um método de determinar uma substância na presença de outras semelhantes. A seletividade é o primeiro parâmetro no desenvolvimento de um método instrumental de separação. Se a seletividade não for assegurada, parâmetros como linearidade, tendência e precisão estarão certamente comprometidos.<sup>32</sup>

Considerando o que se encontra no documento do INMETRO a seletividade pode ser assegurada utilizando ou não materiais de referência.<sup>31</sup> Apesar de a utilização do material de referência conferir para a validação uma confiança a mais, não é estritamente necessária. Caso não se tenha a disposição materiais de referência para o estudo da seletividade pode-se utilizar amostras reais que contenham os compostos suspeitos de gerar interferência na presença do analito e então avaliar se a presença desses interferentes acentua ou inibe o sinal analítico de interesse. Se houver alteração torna-se necessária um maior ajuste do método ou a escolha de outro que se comporte de maneira seletiva.

Com a presença de materiais de referência faz-se as análises com as amostras e os materiais de referência com o método em estudo e em outros

métodos validados, então se observa a capacidade do método em estudo de dosar o analito na presença dos interferentes.<sup>31</sup>

Existem várias maneiras de se calcular a seletividade. Na cromatografia a maneira mais utilizada de se avaliar essa figura de mérito é pela avaliação da matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com a substância (padrão). Porém para que essa maneira seja possível de ser realizada nenhum interferente deve eluir no tempo característico de retenção do analito em estudo, esse deve estar bem definido e separado dos demais compostos presentes na amostra.<sup>32</sup>

### **2.9.2 Linearidade e sensibilidade**<sup>31, 32</sup>

A linearidade é a capacidade do método produzir resultados diretamente proporcionais entre a concentração e o sinal analítico numa determinada faixa. Esse parâmetro é obtido através de padronizações que pode ser interna ou externa. Essa relação entre sinal e concentração depois de devidamente tratada fornece uma relação matemática que é utilizada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. Essa relação matemática é obtida através de um gráfico de dispersão entre o sinal e a concentração e apresenta a seguinte forma:

$$Y = ax + b$$

Onde:

Y = resposta analítica

X = concentração

a = interseção com o eixo y

b = inclinação da curva analítica

Quanto maior o valor de “b” mais inclinada a curva analítica e maiores os valores de “y” para o incremento em “x”, ou seja, quanto maior o valor de “b” maior a sensibilidade do método em questão. A sensibilidade é o parâmetro que mede o quanto o sinal aumenta com o incremento de concentração, e é expresso pelo coeficiente angular da curva analítica, “b”.

Quando se trabalha com cromatografia o sinal analítico é, comumente, a área do pico cromatográfico. Podendo, também, ser utilizada a altura do pico. A utilização da área para esse parâmetro é mais indicada, pois variações naturais em algumas condições cromatográficas podem alterar a altura do pico, porém a área tende a permanecer constante.

A linearidade de um método pode ser avaliada através de um gráfico que correlacione às concentrações e sinais analíticos. Para que esse gráfico seja fidedigno são necessários vários níveis de concentração, no mínimo 5, para construí-lo. A regressão linear dos pontos nesse gráfico nos fornece a curva analítica.

A linearidade é normalmente avaliada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) que representa o ajuste dos dados ao modelo linear.

### 2.9.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação<sup>31, 32</sup>

#### ✓ Limite de detecção

O limite de detecção refere-se a menor quantidade do analito ao qual o método é capaz de distinguir de seu próprio ruído com certa confiabilidade. É a menor concentração na qual se pode tirar alguma conclusão sobre a presença do analito, em questão, na amostra. Quando se trabalha com analitos em níveis traço, na amostra, é de fundamental importância que se conheça o limite de detecção do método, para que não haja falsas conclusões sobre sua presença.

Para o cálculo do limite de detecção existem diversas modalidades de forma que cabe ao experimentador escolher qual a melhor para a sua amostra. Para cada tipo de amostra ou método de detecção a forma de cálculo do limite de detecção pode variar, devido a isso não existe um modelo único para o cálculo de tal fator, tornando essa uma decisão muito pessoal. Sendo assim alguns cálculos do limite de detecção de baseiam em métodos visuais, outros na relação sinal-ruído e ainda pode-se contar com métodos baseados na curva analítica.

O INMETRO utiliza-se do método sinal ruído em seu documento orientativo, no qual deve-se realizar leituras de brancos, mínimo 7, e assim de acordo com a médias e desvio calcula-se o limite de detecção, de acordo com a Tabela 4 retirada do documento.

**Tabela 4** – Metodologias de cálculo de Limites de Detecção (Adaptado, INMETRO, 2011).<sup>33</sup>

Matriz	Cálculos
Branco da amostra	$LD = X + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot S$ sendo: $X$ = média dos valores dos brancos da amostra; $t$ é a distribuição de <i>Student</i> ,

	dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e, s = desvio-padrão amostral dos brancos da amostra.
<b>Branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito</b>	$LD = 0 + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s$ sendo: $t$ = distribuição de <i>Student</i> , dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e, s = desvio-padrão amostral dos brancos da amostra, com adição.

#### ✓ Limite de quantificação

Diferente do limite de detecção, o limite de quantificação refere-se a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com certa confiabilidade com a metodologia proposta.

Na Tabela 5, retirada do documento orientativo do INMETRO, estão descritas algumas metodologias de cálculo do limite de detecção.

**Tabela 5** – Metodologias de cálculo de Limites de Quantificação (Adaptado, INMETRO, 2011).<sup>33</sup>

<b>Matriz</b>	<b>Cálculos</b>
<b>Branco da amostra</b>	$LQ = X + 5s$ ou $LQ = X + 6s$ ou $LQ = X + 10s$ onde: X = média dos valores dos brancos s = desvio-padrão amostral dos brancos
<b>Branco com adição de concentrações variadas do analito, próximas ao LD</b>	- Medir, uma vez cada replicata independente, a cada nível de concentração. - Calcular o desvio-padrão amostral “s” do valor do analito, para cada concentração. - Fazer o gráfico “concentração” versus “s”, e atribuir um valor para o LQ, por inspeção.

#### 2.9.4 Exatidão ou Recuperação

Uma das formas mais utilizadas para se avaliar a tendência é o estudo da recuperação analítica. Normalmente nos processo para avaliar a tendência são usados materiais de referências (MRV) ou comparações interlaboratoriais, bem como a realização dos ensaios de recuperação.<sup>33</sup>

A tendência, ou recuperação pode ser expressa como representado abaixo<sup>33</sup>:

$\text{Tendência} = \frac{\text{Valor observado} \times 100}{\text{Valor esperado}}$
--

O erro relativo é uma forma muito usual de se representar a exatidão, pois representa de uma forma direta o quanto o valor observado se desviou do valor esperado. Uma forma simples de se avaliar a exatidão de um método é utilizar os valores obtidos nos ensaios de recuperação. A expressão que representa o erro relativo está representada abaixo:

$$ER = \frac{\text{Valor observado} - \text{valor esperado} \times 100}{\text{Valor esperado}}$$

A metodologia de extração de um analito de uma determinada amostra deve ser a mais eficiente possível e funcionar de forma reprodutiva, ou seja deve-se obter valores que circundem o 100% para a recuperação do analito em questão, pois trabalha-se em nível traço, e a extração deve funcionar sempre na mesma proporção. Para esse estudo torna-se necessário o calculo da recuperação. Para o cálculo é feita a comparação da resposta obtida para o analito adicionado na matriz e extraído, com a resposta obtida para o analito em amostras preparadas em solvente, de forma que os valores obtidos, após a leitura, devem ser estatisticamente iguais.<sup>32</sup>

A recuperação pode ser calculada analisando-se amostras fortificadas, com o analito de interesse, em três níveis de concentração distintos, uma no começo da curva analítica, uma no meio e outra no final. A expressão que representa este cálculo está descrita abaixo<sup>33</sup>:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left( \frac{C1 - C2}{C3} \right) \times 100$$

Onde C1 representa a concentração do analito na amostra fortificada, C2 representa a concentração do analito em amostra branca e C3 representa a concentração do analito adicionada à amostra fortificada.<sup>33</sup>

### **2.9.5 Precisão**

A precisão representa o desvio entre os resultados dos ensaios obtidos para uma mesma amostra. Normalmente essa figura de mérito é expressa em termos de desvio padrão e coeficiente de variação, que podem ser representadas pela repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade que representam de forma importante a precisão.

✓ **Repetitividade**<sup>33</sup>

A concordância dos resultados de medições sucessivas de um método é definida repetitividade. Essas análises devem ser analisadas sob as mesmas condições de medição, mesmo procedimento, laboratório, analista e estas repetições devem ser feitas em um curto intervalo de tempo. Quantitativamente, a repetitividade pode ser expressa em termos da dispersão dos resultados e pode ser determinado por meio de análises de padrões, material de referência ou adição do analito ao branco da amostra em várias concentrações na faixa de trabalho.

Para definir se as diferenças entre as análises realizadas são significativas, calcula-se o limite de repetitividade a partir dos valores de desvio padrão dos resultados dos resultados dos ensaios.

✓ **Precisão Intermediária**<sup>33</sup>

A precisão intermediária diferencia-se da repetitividade em relação a alguns parâmetros que são variados durante as análises. Na precisão intermediária as análises são realizadas por diferentes analistas, em diferentes equipamentos e em tempos diferentes. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório.

✓ **Reprodutibilidade**<sup>33</sup>

A reprodutibilidade é análise da qualidade de um método, sua precisão, entre laboratórios diferentes. O teste é feito utilizando o mesmo método, e as mesmas amostras em laboratórios diferentes, sendo as análises também realizadas por analistas diferentes.

O calculo do coeficiente de variação pode ser realizado facilmente a partir da expressão abaixo<sup>33</sup>:

$$CV (\%) = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{Concentração média determinada}} \times 100$$

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### ✓ Materiais

- Vidrarias volumétricas e não volumétricas
- Frascos de amostragem de urina de 60 mL
- Cartuchos SPC C18
- Cromatógrafo líquido com detecção UV/VIS- Varian 920-LC
- Espectrômetro de absorção molecular Agilent e modelo 8453
- Caixa térmica de isopor

#### ✓ Reagentes

- Padrão de ivermectina sigma aldrich pureza superior a 95%
- Acetonitrila grau HPLC
- Metanol grau HPLC
- Água destilada e deionizada
- Trietilamina PA
- Hexano grau HPLC

#### ✓ Soluções

- Solução estoque
  - Preparou-se uma solução estoque de concentração 750 mg/L em metanol grau HPLC, e a partir dessa solução, preparou-se as soluções para obtenção da curva analítica. A solução estoque e as soluções para curva analítica foram acondicionadas sobre refrigeração.
- Curva analítica
  - A curva analítica foi construída para respeitar a norma da codex alimentarius que determina que o limite máximo de resíduo (LMR) para a ivermectina em amostras de leite é de 10  $\mu\text{gL}^{-1}$ . Normas da ANVISA foram consultadas, porém este órgão não apresenta LMR para a ivermectina em leite bovino. Foram preparadas soluções do analito em metanol nas concentrações de 5, 15, 25, 45, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450  $\mu\text{gL}^{-1}$ , para estudo de faixa linear e cálculo de algumas das figuras de mérito presentes na validação da metodologia.

- Solução extratora
  - Para o preparo da solução extratora adicionou-se 700 mL de água destilada e deionizada em 300 mL de acetonitrila grau CLAE (Vetec) e 1 mL de trietilamina grau para análise (Merck). Essa foi estocada e utilizada para a extração das amostras de validação.

### 3.1 Lavagem da vidraria

Todas as vidrarias utilizadas durante o decorrer desse trabalho foram tratadas de forma rigorosa para assegurar que não houvesse risco de contaminação. Primeiro as vidrarias foram lavadas com detergente comum para a retirada do resíduo bruto, e então enxaguada com água de torneira. Em seguida, as vidrarias foram deixadas por 24 horas de molho em solução de detergente alcalino Detertec 5% v/v. Em seguida enxaguou-se as vidrarias com água corrente da torneira. Após essa etapa, utilizou-se KOH 5% v/v, preparado com álcool etílico absoluto Vetec, para remoção de possíveis contaminantes orgânicos presentes na vidraria. As vidrarias foram enxaguadas abundantemente com água corrente da torneira, em seguida com água destilada por diversas vezes.

Ao término do enxague, as vidrarias não volumétricas, foram secas a uma temperatura de 450° C em mufla e as vidrarias volumétricas foram secas à temperatura ambiente e logo após foram armazenadas em local limpo e fechado para que não houvesse contaminação por partículas presentes na atmosfera.

### 3.2 Amostragem

A amostra de leite utilizada como branco para a validação da metodologia utilizada foi coletada em zona rural do município de Rubiataba – GO, em animal sadio. O leite foi coletado direto nos animais no dia anterior à aplicação das vacinas, no total de 10 animais, entre elas a ivermectina (Ivomec), de forma a se ter certeza que o leite obtido para as análises estava livre do fármaco.

A amostra foi coletada em dez frascos de amostragem de urina previamente higienizados, da mesma forma que as vidrarias volumétricas, com capacidade de 60 mL, posteriormente foram acondicionadas em freezer doméstico, -11° C, para congelamento, para que fosse feito o transporte com segurança. Então foi



encaminhada para o Laboratório de Química Analítica e Ambiental, onde as amostras foram misturadas para uma melhor representatividade. Foram mantidas sob congelamento até o momento da análise.

### 3.3 Determinação por cromatografia

As soluções preparadas para a curva analítica descritas no item 3.4 foram colocadas em *vials* e levadas para análise em um Cromatógrafo Líquido-CL acoplado em um detector UV/VIS Varian 920-LC, com sistema de injeção automático. As condições cromatográficas foram otimizadas nos aspectos de fase móvel, fluxo, coluna, tempo de corrida e comprimento de onda. O cromatógrafo utilizado nas análises está ilustrado na Figura 3.



**Figura 3.** Cromatógrafo líquido com detecção UV/VIS- Varian 920-LC.

Os parâmetros ótimos empregados para a leitura da curva analítica e demais análises realizadas estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Parâmetros cromatográficos otimizados para cromatógrafo Líquido com detecção por UV-Vis para determinação da 22,23dihidroavermectina.

<b>Parâmetro</b>	
<b>Coluna</b>	Coluna <i>Phenomenex</i> C18, 10 cm, ID 46µm
<b>Fase Móvel</b>	Metanol/acetonitrila/água 65/35/5 (v/v/v)
<b>Fluxo</b>	1,0 ml/mim
<b>Comprimento de onda</b>	245 nm

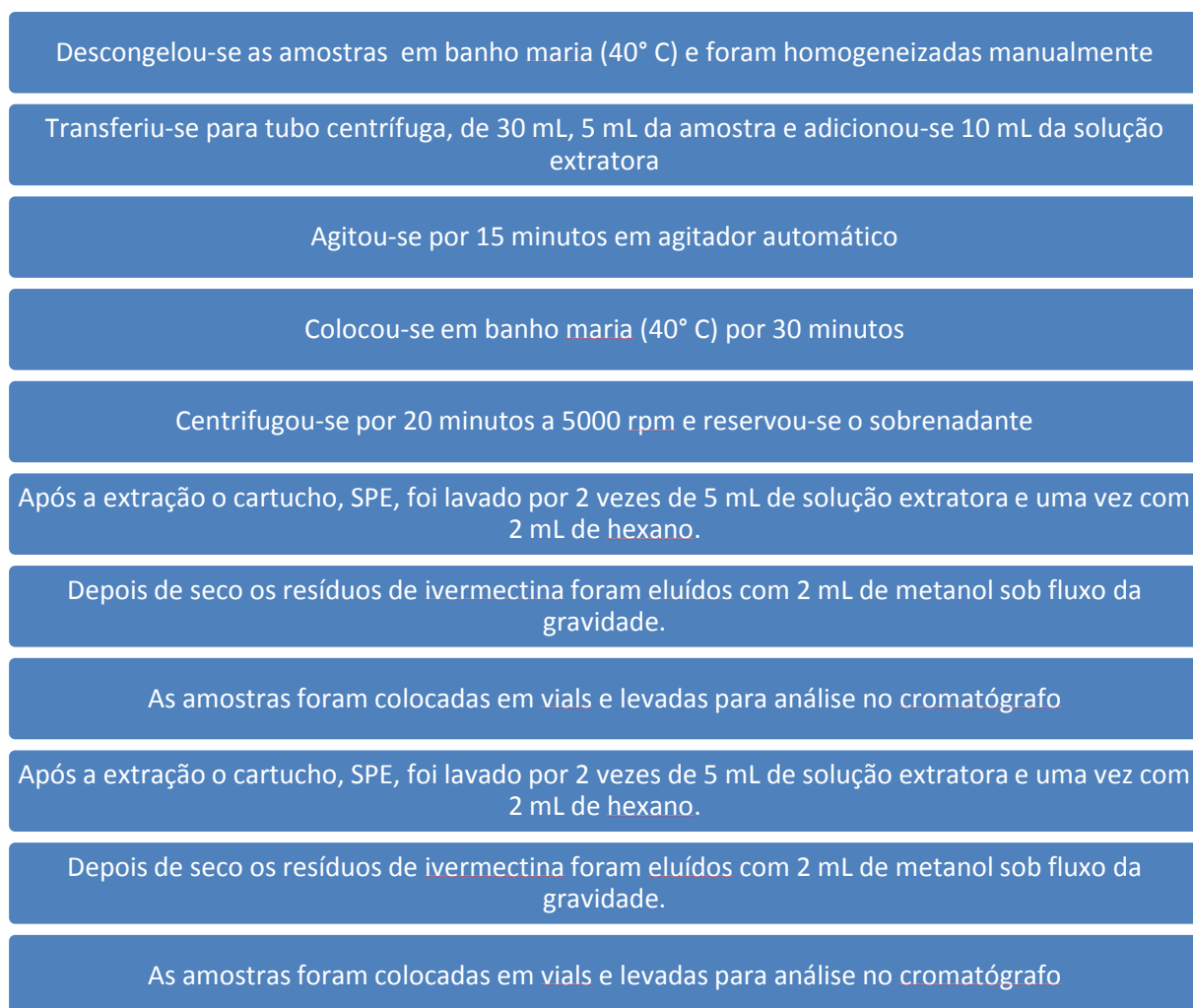
Após as leituras a calibração foi realizada através do método de regressão linear e então a curva analítica foi obtida.

### 3.4 Extração

A metodologia de extração foi baseada no estudo de Souza e colaboradores, 2007<sup>29</sup>, que utilizaram para a determinação a técnica de cromatografia líquida acoplada a detector de fluorescência, porém a etapa de derivatização foi suprimida devido ao fato da ivermectina naturalmente absorver em comprimentos de onda pertencentes a zona do ultravioleta no espectro eletromagnético.

#### 3.4.1 Sequência de extração

A sequência referente a extração esta descrita no fluxograma apresentado na Figura 4.



**Figura 4.** Sequência de extração da Ivermectina na Amostra.

### 3.5 Validação do método

O documento INMETRO DOQ-CGCRE-008 foi utilizado como base para a validação da metodologia descrita. O documento é uma orientação para a validação de ensaios químicos, o qual descreve como devem ser realizadas e calculadas as figuras de mérito necessárias para a validação da metodologia em questão. A validação é importante para assegurar que as análises estão fornecendo resultados fidedignos e não falsos.

As figuras de mérito calculadas foram sensibilidade, linearidade, recuperação, limite de detecção e quantificação, seletividade e precisão.

#### 3.5.1 Seletividade

Esta figura de mérito foi calculada através da análise de 7 réplicas autênticas de uma amostra dopada para 450 µg/L e 7 replicatas dessa mesma concentração porém da solução padrão, sem a presença da matriz. Para posterior comparação realizou-se também a análise de 7 réplicas autênticas de amostra sem a presença do analito. Os cromatogramas foram analisados visualmente para a verificação da presença de contaminantes e posterior realização dos testes estatísticos pertinentes, sendo eles F (Snedecor) e *t-student*. Todas as leituras foram realizadas em triplicata e posteriormente calculou-se a média aritmética entre elas, para os cálculos posteriores.

#### 3.5.2 Linearidade e sensibilidade

A linearidade é expressa através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) que é obtido pela curva analítica. Para o estudo da linearidade foi construída curva analítica nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 e 450 µg/L, o solvente utilizado foi metanol grau HPLC, as leituras foram feitas em triplicata. A sensibilidade é facilmente observada pela equação que descreve o gráfico da curva analítica, sendo que o coeficiente angular dessa equação linear representa a quantidade de sinal que é incrementado com a variação da concentração. Todos os pontos da curva foram preparados através da solução estoque de ivermectina.

#### 3.5.3 Exatidão ou Recuperação

Para o estudo da recuperação utilizou-se amostras de leite dopadas em três concentrações distintas. A amostra utilizada foi coletada antes que houvesse a aplicação das vacinas nos animais de forma a assegurar a ausência da ivermectina nos leites amostrados. As concentrações utilizadas foram 50, 200, e 400 µg/L, de forma que compreendesse todo o ambiente da curva analítica construída, início, meio e fim.

### **3.5.4 Limite de Detecção e Quantificação**

O cálculo dos limites de quantificação e detecção da metodologia partiu da análise de 10 réplicas de brancos amostrais em triplicata, onde os valores são levados à curva analítica e estimadas as respectivas concentrações para previsão dos limites.

### **3.5.5 Precisão**

A precisão foi estimada através da análise de dispersão dos resultados. As análises foram de padrões nas mesmas concentrações das realizadas para o estudo de recuperação e todas lidas em triplicata da mesma forma. Com os resultados foi calculado o desvio padrão.

## **3.6 Tratamento Estatístico**

Para a comparação entre as concentrações obtidas na validação, com a presença da matriz e sem a presença da matriz, foram necessários à realização de alguns testes estatísticos simples, porém de fundamental importância.

O teste t (student) é utilizado para a comparação estatística de grupos de médias, ou seja, saber se estatisticamente duas médias são iguais ou não a um determinado nível de significância, que no presente trabalho foi utilizado 95% para verificação da hipótese alternativa. Porém antes fez-se necessário a realização do teste F (Snedecor) para homogeneidade das variâncias que calcula-se da seguinte forma:

$$F = s_1^2/s_2^2$$

Onde,  $s_1^2$  refere-se a primeira variância amostral e  $s_2^2$  refere-se a segunda variância amostral.

Os valores encontrados após o cálculo do teste são comparados com valores tabelados de referência que consideram o número de graus de liberdade menos uma unidade para cada conjunto de variância. Caso o resultado calculado seja menor que o tabelado as variâncias são consideradas estatisticamente homogêneas e calcula-se o teste t da seguinte maneira:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

Caso as variâncias não sejam consideradas estatisticamente homogêneas calcula-se o teste t da seguinte maneira alternativa:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Onde  $x_1$  e  $x_2$  são respectivamente os valores das médias dos grupos 1 e 2, “n” refere-se ao número de graus de liberdade e “s” ao desvio padrão.  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $n_1$  e  $n_2$  são respectivamente os desvios padrões do grupo amostral 1 e 2 e os graus de liberdade dos grupos 1 e 2.

## 3.7 Otimização cromatográfica

### 3.7.1 Fase móvel

Foram utilizadas para os testes da fase móvel três diferentes composições, uma sendo composta de metanol e água na proporção de 80:20, que é a fase móvel mais utilizada na maioria dos trabalhos que utilizam a cromatografia com detecção no UV-Vis, a segunda foi composta de acetonitrila e água na proporção de 70:30 e por último a fase móvel foi composta dos três anteriores, metanol, acetonitrila e água na proporção de 65:30:5.

Foram realizadas leituras de solução padrão na concentração de 1000 µg/L nas diferentes fases móveis de forma que fosse possível a escolha da que melhor se adaptaria. A única das três opções de fase móvel que apresentou resultado

satisfatório para a concentração analisada foi o trio de metanol, acetonitrila e água (65:30:5), as demais se comportaram de forma similar as soluções de metanol injetadas como branco em todos os casos.

### **3.7.2 Comprimento de onda**

A ivermectina apresenta absorção no ultravioleta, no comprimento de onda, máximo, característico de 245nm, tornando-se possível sua identificação através da espectroscopia de absorção molecular nessa região do espectro eletromagnético. A identificação espectroscópica foi realizada em um equipamento de espectroscopia em UV/VIS da marca Agilent e modelo 8453. Preparou-se 5 soluções de concentrações 10, 20, 30, 40 e 50 mgL<sup>-1</sup> em metanol grau HPLC. O comprimento de onda máximo obtido destas análises foi utilizado como parâmetro do comprimento de onda para as análises no cromatógrafo líquido.

### **3.7.3 Coluna**

A coluna utilizada, Phenomenex C18, 10cm, ID 46µm, se mostrou bem eficiente na separação da ivermectina. Por ser menor que as colunas comumente utilizadas fornece resultados mais rapidamente e apresentou separação comparável as colunas encontradas na literatura. Assim o parâmetro coluna não foi otimizado, ou seja, não foram testadas outras colunas.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na literatura, a grande maioria dos trabalhos publicados não utilizam a detecção por UV-Vis para a análise de traços de Ivermectina, em sua maioria utilizam a detecção por fluorescência, e mais recentemente, os trabalhos mais inovadores vem utilizando a espectrometria de massas, que são técnicas mais sensíveis ao analito. De forma que se teve dificuldade para encontrar publicações com parâmetros para se aplicar à metodologia proposta, já que para a detecção no espectrômetro de massas necessita-se de pouquíssima amostra e na detecção por fluorescência necessita-se da realização de uma etapa adicional ao preparo de amostra, a derivatização, que consiste em uma alteração química do analito para que o torne fluorescente. Assim em ambas as metodologias mais encontradas na literatura os parâmetros são bastante característicos para cada uma delas o que conduziu-se esse trabalho à realização de diversos testes para encontrar uma metodologia aplicável.

### 4.1 Otimização da metodologia

Os primeiros parâmetros otimizados foram as condições cromatográficas, ou seja, encontrar o conjunto de condições (fluxo, fase móvel, comprimento de onda, tempo de corrida e coluna) que forneceria resultado cromatográfico que fosse proporcional a concentração e conseguisse dar condições de quantificar com exatidão o analito em estudo.

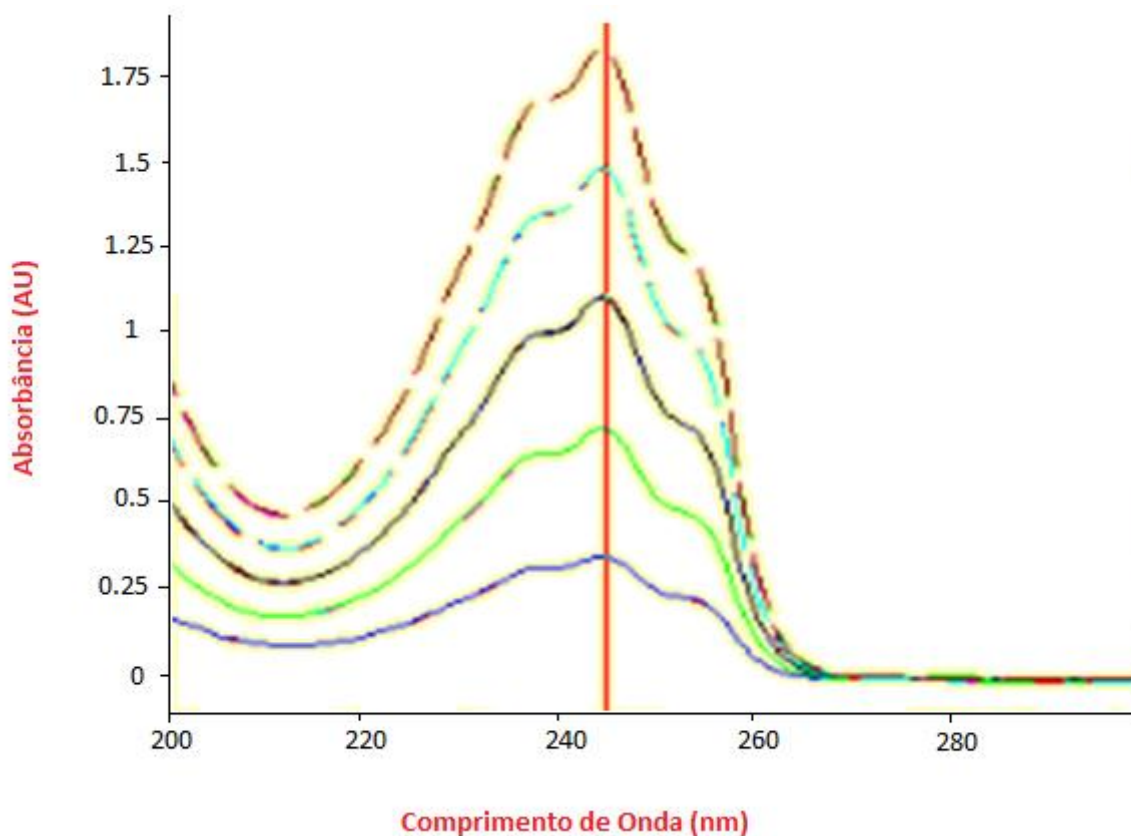
A coluna utilizada foi a *Phenomenex C18*, 10 cm, ID 46µm, de forma que foi colocada como um parâmetro fixo, não passível de otimização.

Testou-se três diferentes composições para a fase móvel e para o fluxo, e o comprimento de onda foi obtido através da espectroscopia no UV-Vis.

O tempo de corrida é o último aspecto a ser otimizado, pois para determinar onde a corrida termina tem-se primeiro que conhecer o tempo de retenção do analito, que é o tempo em que o analito estudado demora desde sua injeção até a passagem pelo detector, após esse tempo a corrida pode terminar, pois o que vem depois teoricamente não é interessante para a quantificação do analito.

#### 4.1.1 Determinação do comprimento de onda

Os espectros, das diferentes concentrações de ivermectina, obtidos estão demonstrados na Figura 5.



**Figura 5.** Espectros da ivermectina nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 mg/L na faixa de 200 a 300 nm.

Conforme aumenta-se a concentração de ivermectina o sinal aumenta proporcionalmente. Obtido, então, o sinal da ivermectina, basta encontrar em que ponto ele é mais alto para determinar o comprimento de onda que dará maior sensibilidade nas medidas no cromatógrafo, já que o detector também se baseia no UV-Vis.

De acordo com o que podemos observar na Figura 5, o comprimento de onda máximo é em 245 nm.



### 4.1.2 Determinação da fase móvel

A Figura 6 mostra os cromatogramas obtidos pelas análises do padrão na concentração de 1000 µg/L nas diferentes fases móveis.



**Figura 6.** Cromatograma da solução padrão de ivermectina em metanol HPLC na concentração de 1000 µg/L com a fase móvel acetonitrila e água (70:30) (a), metanol, acetonitrila e água (65:30:5) (b) e metanol e água (80:20) (c), tempo de retenção 5 minutos, comprimento de onda 245 nm e fluxo de 0,7 mL/min.

Pode-se observar no cromatograma “b” que encontram-se dois picos presentes no cromatograma, o primeiro refere-se ao pico do metanol, solvente utilizado no preparo dos padrões, que encontra-se no cromatograma no tempo de retenção de 1,25 minutos. Já o segundo pico refere-se ao sinal da ivermectina, o pico aparece visualmente bem definido, e seu tempo de retenção é de 2.62 minutos.

Portanto pode-se concluir desse resultado que a fase móvel foi capaz de trabalhar de forma sinérgica com a coluna a ponto de fornecer uma separação bem definida entre a ivermectina e o metanol. Assim pode-se considerar o uso dessa fase móvel para a realização das demais análises.

O cromatograma “c” mostra o resultado que foi obtido utilizando a fase móvel composta de metanol e água (80:20), observa-se que o pico do solvente metanol encontra-se bem destacado no cromatograma e seu tempo de retenção bem similar ao encontrado na figura 5, porém o pico referente a ivermectina aparece bem menos evidente que no caso anterior, seu tempo de retenção encontra-se em 2,62 minutos assim como encontrado anteriormente.

O cromatograma “a” mostra o resultado obtido com a fase móvel composta por acetonitrila e água, assim como nos demais testes o pico do metanol, solvente utilizado no preparo do padrão, apareceu de forma bastante evidente, porém no foi observado o pico referente à ivermectina. Dessa forma pode-se concluir que essa fase móvel não separou a ivermectina, impossibilitando a sua detecção.

Diante desses resultados pode-se afirmar que a fase móvel composta por metanol, acetonitrila e água se comportou de forma mais eficaz, para a separação da ivermectina, que a fase móvel composta, apenas, por metanol e água.

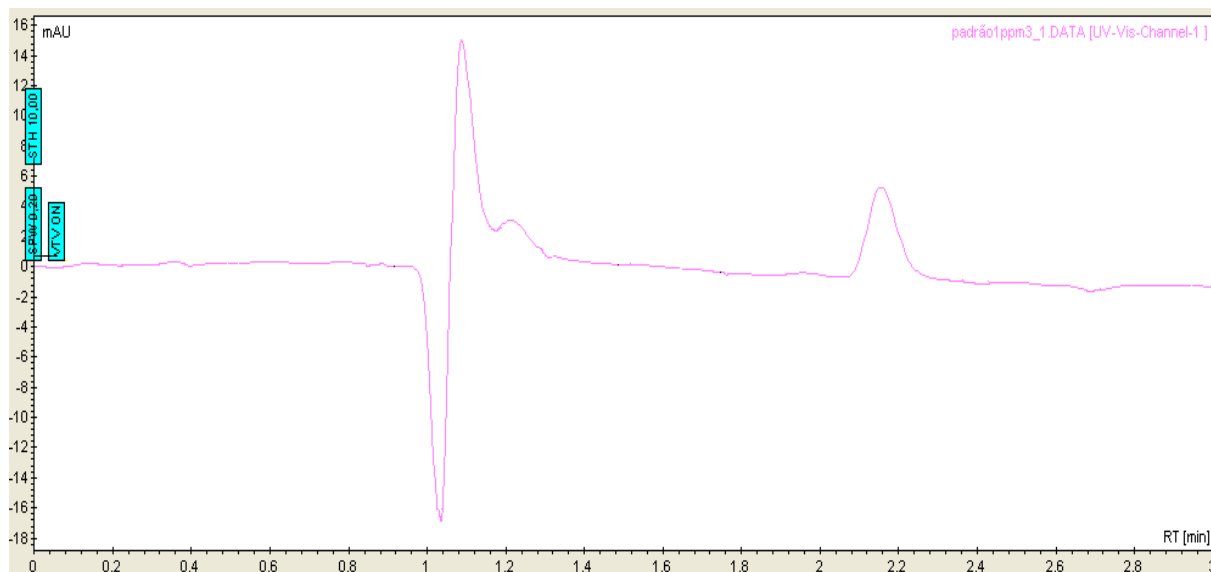
Conclui-se, de todos os resultados obtidos, que a fase móvel composta por acetonitrila, metanol e água apresentou os melhores resultados para a detecção de ivermectina. Fica evidente que o sinal analítico nessa fase móvel é muito maior do que o apresentado pelas demais fases móveis testadas.

### **4.1.3 Determinação do tempo de corrida e fluxo**

O tempo de corrida foi determinado empiricamente. Não foram encontrados estudos publicados de determinação de ivermectina na coluna *Phenomenex* C18, 10 cm, ID 46µm.

Após as primeiras corridas observou-se que em fluxo de 0,7 mL/min a ivermectina tinha um tempo de retenção de 2,62 minutos, e estipulou-se o tempo decorrida em 5 minutos. Alterou-se então o fluxo para 1 mL/min onde o tempo de retenção diminuiu para cerca de 2,18 minutos e o tempo de corrida foi novamente corrigido para 3 minutos, onde foi mantido até o fim das análises.

A Figura 7 mostra o cromatograma obtido com os parâmetros otimizados. Pode-se observar o deslocamento do pico tanto do solvente, como da ivermectina para menores tempos de retenção. Apesar da diferença entre os tempos de retenção entre os fluxos 0,7 e 1 mL/min não ser tão grande, obteve-se uma economia de 2 minutos em cada corrida, no caso de leitura de muitas amostras torna-se bastante interessante.

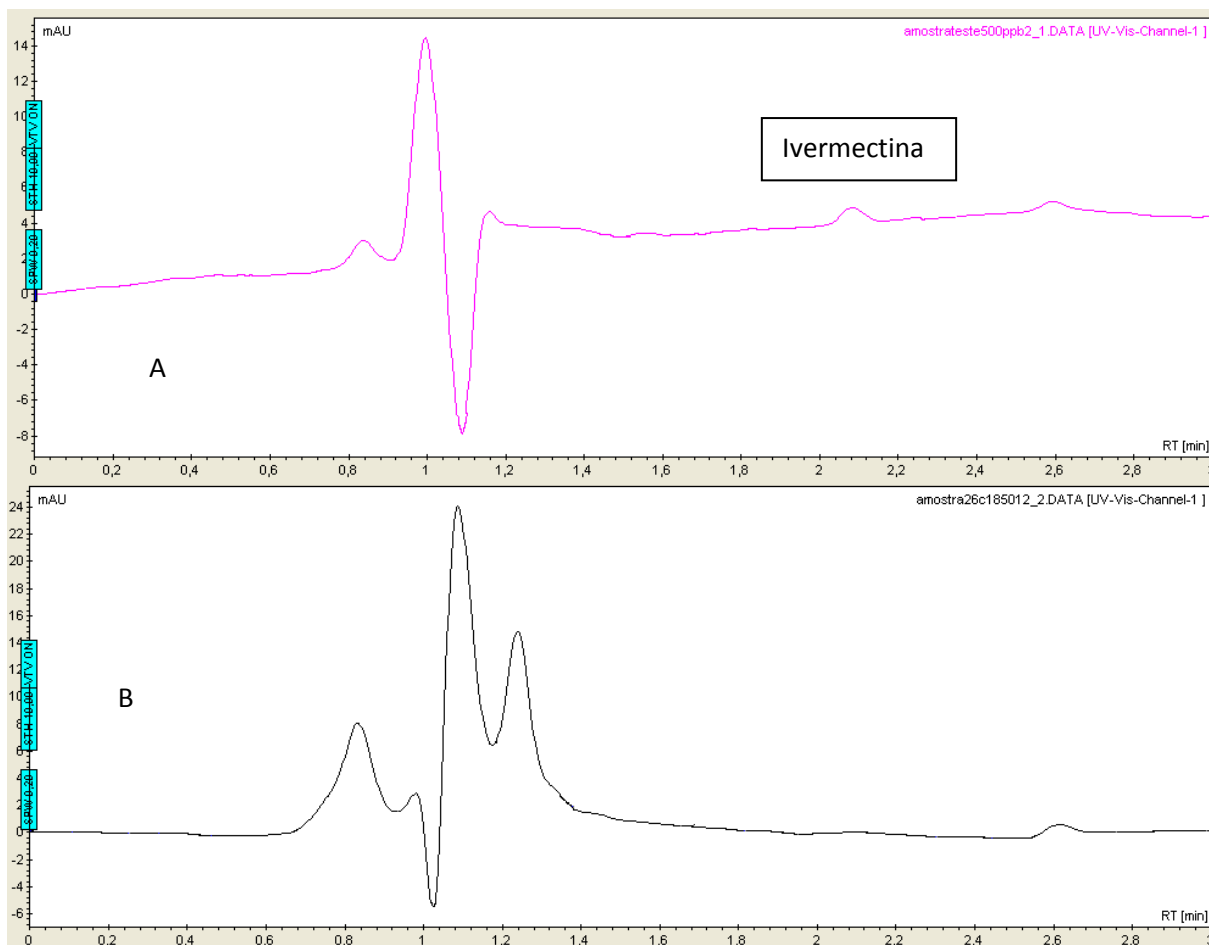


**Figura 7.** Cromatograma da solução padrão de ivermectina em metanol HPLC na concentração de 1000  $\mu\text{g/L}$  com a fase móvel metanol, acetonitrila e água (65:30:5), tempo de retenção 3 minutos, comprimento de onda 245 nm e fluxo de 1,0 mL/min.

## 4.2 Validação da metodologia

### 4.2.1 Seletividade

A Figura 8 mostra a comparação entre dois cromatogramas, um onde a amostra foi fortificada com 450  $\mu\text{g/L}$  e outro branco.



**Figura 8.** Cromatogramas de amostra fortificada com padrão de ivermectina (A) e cromatograma de amostra branca, sem a presença do analito (B).

Observando a Figura 8 pode-se verificar visualmente que não houve co-eluição de nenhum interferente juntamente com a ivermectina pelo método aplicado.

Estatisticamente dizemos que um método é seletivo quando a comparação das médias de resultados de uma determinada concentração do analito disperso em uma matriz é estatisticamente igual aos resultados dessa mesma concentração do analito apenas em solvente. Dessa forma como descrito no item 3.8 realizou-se os testes F e t para averiguação de similaridades nas médias (Tabela 7).

**Tabela 7.** Valores calculados dos testes F e T com 95% de confiança e n=7.

Concentração ( $\mu\text{g/L}$ )	Área com analito e matriz	Área com analito Sem matriz	$F_{\text{calculado}}$	$T_{\text{calculado}}$
450	0,167	0,197	1,035	0,535

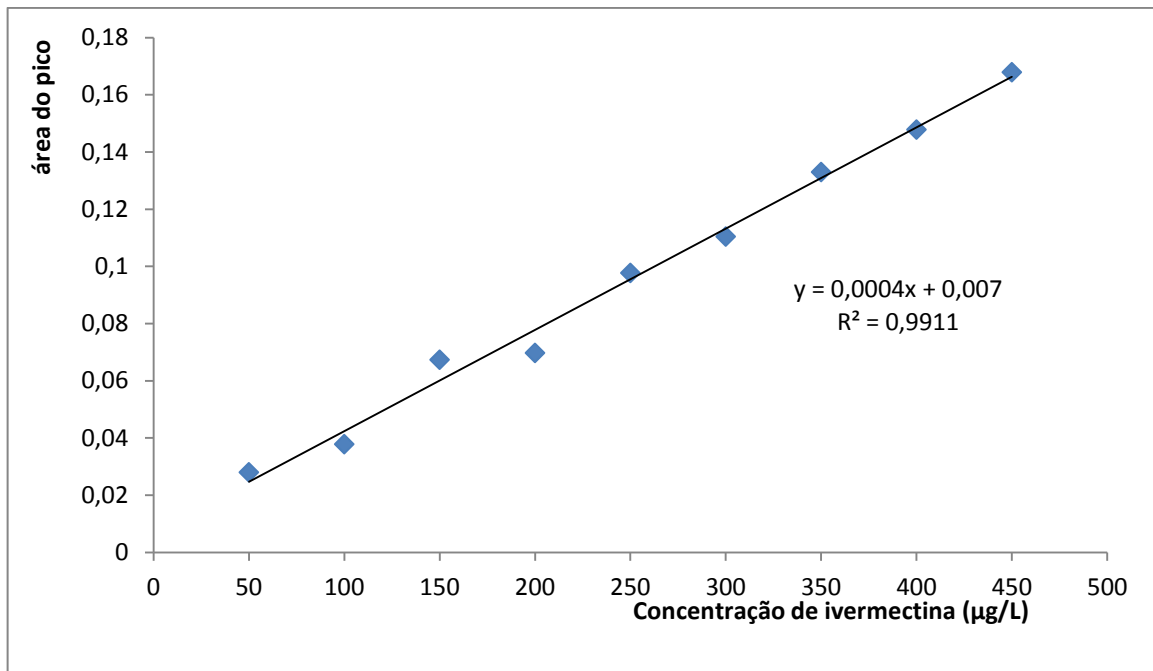
Tomando que para 95 % de confiança e número de graus de liberdade igual a  $n-1$ , encontra-se tabelado o valor de  $F_{\text{tab}} = 4,28$  e  $t_{\text{tab}} = 1,812$ . Observa-se que o valor calculado de  $F_{\text{calc}}$  é menor que o valor tabelado de  $F_{\text{tab}}$  o que significa que as variâncias tanto das leituras com a matriz quanto as variâncias das leituras sem a matriz são estatisticamente iguais, o que significa que a matriz não influencia na precisão da quantificação. Observa-se de igual modo que o valor calculado para o teste t student é menor que o tabelado, o que estatisticamente significa que as duas médias são iguais com 95% de confiança. Assim pode-se afirmar que a matriz não apresenta influencia significativa nas leituras das amostras.

Com base nos resultados obtidos pode-se afirmar que a metodologia aplicada é seletiva, pois a matriz não exerce influências significativas na quantificação do analito.

#### **4.2.2 Linearidade e Sensibilidade**

A curva analítica foi preparada com pontos em excesso para que fosse estudada a faixa linear. Dessa forma foram construídos os seguintes pontos: 5, 15, 35, 45, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 $\mu\text{g/L}$ . Porém as concentrações de 5, 15, 35 e 45 $\mu\text{g/L}$  não apresentaram sinal analítico que se diferenciava do ruído do equipamento, assim a curva analítica foi construída a partir da concentração de 50  $\mu\text{g/L}$ .

A curva analítica, assim como a regressão e o valor do coeficiente de determinação, estão expressos na Figura 9. Observa-se que o coeficiente de determinação é superior a 0,90 que é o valor mínimo aceito pelo documento orientativo do INMETRO.

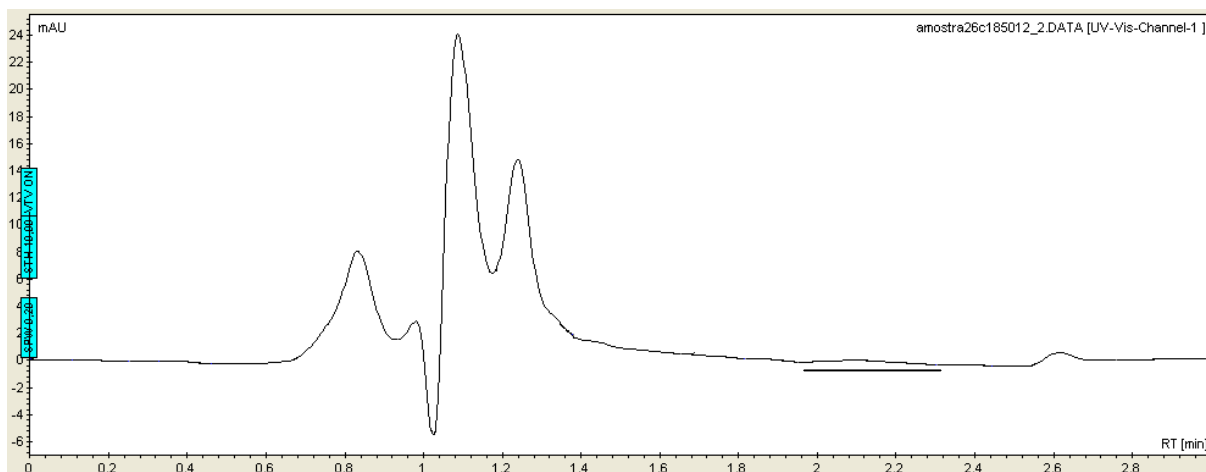


**Figura 9.** Curva analítica utilizada na validação da metodologia com concentração variando de 50 a 450 µg/L.

### 4.2.3 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com base nas leituras das amostras brancas. Realizou-se a leitura de 10 amostras brancas e os limites foram estimados da seguinte forma: LD = média dos valores dos brancos + 5 vezes o desvio padrão amostral dos brancos, e LQ = média dos brancos + 10 vezes o desvio padrão amostral dos brancos.

A Figura 10 ilustra um cromatograma de amostras brancas para o cálculo dos limites de detecção e quantificação. Apesar de, qualitativamente, não se observar sinal analítico, ao solicitar a integração no tempo de retenção da ivermectina obtêm-se valores positivos que interferem nas leituras de menores concentrações, e em escalas muito pequenas impede a quantificação e até a detecção. Observa-se no cromatograma um sinal, desconhecido, em 2,62 minutos, porém não interfere no tempo de retenção da ivermectina.



**Figura 10.** Cromatograma de amostra branca utilizado no cálculo dos LQ e LD. A linha representa a faixa que foi integrado.

A Tabela 8 mostra os valores calculados para os limites de detecção e quantificação. Observa-se que a metodologia é capaz de quantificar teores de ivermectina acima de 49,350  $\mu\text{g/L}$ , entretanto valores abaixo desse serão apenas detectados sem informações quantitativas sobre concentração. Isso limita a utilização da metodologia, pois o LMR proposto, pela Codex Alimentarius, é de 10  $\mu\text{g/L}$ . Entretanto, a quantificação, de ivermectina, em níveis de  $\mu\text{g/L}$  com detecção por ultravioleta é um grande avanço.

**Tabela 8.** Valores dos Limites de Detecção e Quantificação

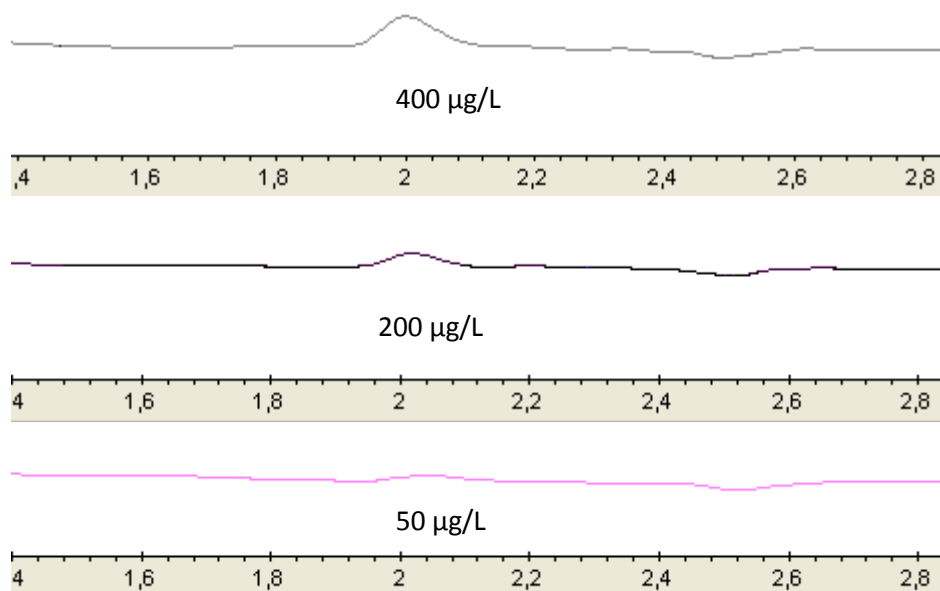
<b>Analito</b>	<b>LD (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>LQ (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>
<b>Ivermectina</b>	19,82	49,35

#### 4.2.4 Exatidão ou Recuperação

A recuperação foi calculada em três níveis, 50, 200 e 400  $\mu\text{g/L}$ . Amostras foram fortificadas nas referidas concentrações e passaram pelo processo de extração descrito no item 3.7. As amostras foram preparadas em triplicata e os valores apresentados representam a média das leituras.

A Figura 11 apresenta os cromatogramas de amostras fortificadas nos níveis de concentração citados acima. A parte referente ao solvente foi cortada para facilitar a visualização dos picos cromatográficos. Pode-se observar que ao aumentar a concentração de ivermectina na amostra o sinal analítico aumenta

proporcionalmente. Conclui-se então, que visualmente a extração esta sendo representativa.



**Figura 11.** Cromatogramas referentes a amostras fortificadas para o teste de recuperação, nas concentrações de 50, 200 e 400 µg/L.

Pode-se observar na Figura 11 a confirmação visual do limite de detecção. A concentração de 50µg/L quase não é observada, porém o software do equipamento ainda é capaz de calcular a área abaixo do pico e fornecer valores a serem considerados.

A Tabela 9 traz descritas as informações sobre a concentração na qual a amostra foi preparada, a média das concentrações estimadas pela regressão linear e a recuperação calculada pelo quociente do valor esperado pelo valor estimado multiplicado por 100. Os valores para a recuperação encontrados foram entre 98% e 110%, o que comprova a eficiência da extração. Conclui-se desses resultados que a extração proposta é eficiente para a análise de ivermectina em leite bovino.

**Tabela 9.** Valores de recuperação nos níveis de concentração de 50, 200, 400 µg/L.

Níveis de Concentração (µg/L)	Concentração estimada (µg/L)	Recuperação (%)
50	55,3±5,2	110,6
200	196,8±7,8	98,4
400	402,5±24,3	100,625



### 4.2.5 Precisão

Na Tabela 10 encontram-se os valores encontrados na Tabela 9 e seus respectivos desvios, assim como os valores calculados de coeficiente de variação. Observa-se que o coeficiente de variação é maior na concentração mais baixa, o que pode sugerir uma interferência do ruído do equipamento nas leituras, pois se encontra muito próxima ao limite de detecção. O melhor resultado encontra-se no meio da curva analítica, onde pelo processo de regressão linear, encontram-se os menores erros.

**Tabela 10.** Valores do coeficiente de variação para análise da precisão e exatidão.

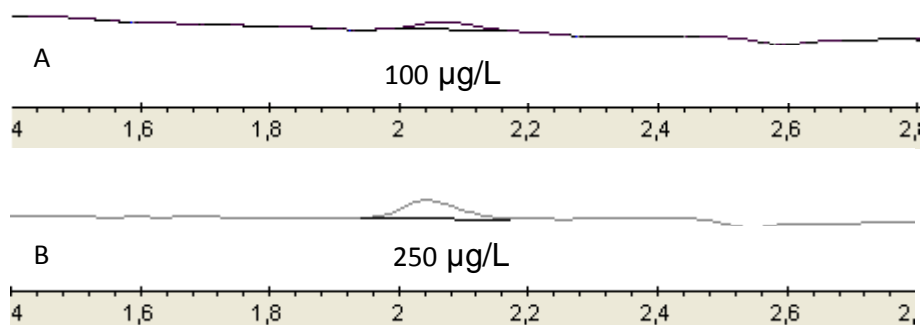
<b>Níveis de Concentração (ug/L)</b>	<b>Concentração estimada (ug/L)</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Coeficiente de Variação (%)</b>
<b>50</b>	55,5	5,23	9,42
<b>200</b>	196,8	7,84	3,98
<b>400</b>	402,5	24,37	6,05

Observa-se que os valores referentes aos coeficientes de variação não foram altens tendo em vista os valores aceitáveis para análises de amostras ambientais a nível traço é de 20%<sup>28</sup>.

### 4.3 Teste da metodologia em amostra fortificada

A metodologia foi testada, para assegurar sua funcionalidade, em amostras dopadas com padrão de ivermectina.

A Figura 12 mostra os cromatogramas dessas amostras fortificadas nas concentrações de 100 e 250 µg/L. Pode-se observar que a relação de proporcionalidade entre sinal e concentração foi mantida. Portanto a metodologia mostra-se utilizável na faixa de concentração proposta.



**Figura 12.** Cromatogramas de amostras fortificadas, com 100 µg/L (A) e 250 µg/L (B)

Pode-se observar (Tabela 11) que os coeficientes da variação continuam abaixo de 20 % assim como aconteceu durante todo o processo de validação. Portanto a metodologia mostra-se aplicável para a determinação da ivermectina em leite bovino.

**Tabela 11.** Valores das médias das leituras nas concentrações de 100 e 250 µg/L, média das leituras, concentração estimada, desvio padrão e os valores dos coeficientes de variação.

<b>Níveis de Concentração (ug/L)</b>	<b>média das leituras</b>	<b>Concentração estimada (ug/L) ± SD</b>	<b>Coefficiente de Variação (%)</b>
<b>100</b>	0,04447	93,68±6,25	6,67
<b>250</b>	0,09768	243,36±15,28	6,27

## CONCLUSÕES

Conclui-se que a metodologia proposta para análise de ivermectina em leite de bovinos é capaz de quantificar o fármaco em concentrações superiores a 49,35 µg/L. A metodologia foi validada com sucesso no intervalo de concentração 50 a 450 µg/L atendendo aos requisitos propostos pelo documento orientativo do INMETRO<sup>31</sup> utilizado como base para a validação dessa metodologia.

As condições cromatográficas foram otimizadas com sucesso o que permitiu a detecção do analito com sensibilidade, porém o detector de UV-Vis não apresenta sensibilidade suficiente para se comparar aos detectores de massas e fluorescência, que são os mais utilizados para esse tipo de analito e matriz.

Devido ao detector de UV-Vis, a faixa linear e os limites de detecção, 19,82µg/L, e quantificação, 49,35 µg/L deixaram a desejar já que em concentrações inferiores a 49,35µg/L não há possibilidades de quantificação, de forma que os limites ficaram acima do LMR de ivermectina para leite de bovinos, que segundo a Codex Alimentarius é de 10 µg/L<sup>30</sup>.

A extração se mostrou bastante eficaz oferecendo valores de recuperação entre 98 e 110%.

A metodologia se mostrou seletiva não apresentando interferências provenientes da matriz complexa, que é o leite de bovinos, e exata oferecendo coeficiente de variação abaixo de 20% em todos os níveis estudados.

## PERSPERTIVAS

A utilização da ivermectina como antiparasiticida na bovinocultura brasileira é de fundamental importância para a manutenção da saúde dos animais, sua alta eficiência em combater endo e ectoparasitas torna a sua utilização indiscriminada entre os produtores, apesar da recente proibição da fabricação e utilização das avermectinas em território nacional em muitos casos os produtores não suspenderam o uso.

Devido à falta de conhecimento sobre a contaminação crônica por ivermectina torna-se de fundamental importância o desenvolvimento de metodologias que sejam facilmente aplicadas à rotina de monitoramento, de forma que facilite a detecção e quantificação de resíduos dessa droga no leite. O estudo mais aprofundado sobre os efeitos da ivermectina no organismo humano é de suma importância para o conhecimento dos riscos em potencial da contaminação crônica por esse fármaco.

Para prosseguimento da pesquisa seria interessante à coleta de amostras após a aplicação da ivermectina, em tempos pré-programados, de forma a construir um perfil de eliminação do fármaco no leite dos animais. Assim, ter-se-ia um conhecimento sobre o tempo que o fármaco demanda para ser eliminado completamente, ou encontrado em níveis aceitáveis, no leite.

A metodologia proposta precisa de adaptações para que tenha limite de detecção concordante com o LMR proposto pela codex alimentarius. A alteração do detector, de forma a proporcionar uma maior sensibilidade, é a proposta mais aceitável. Porém, utilizando o mesmo detector seria necessário a realização de pré-concentração, mais eficiente, na etapa do preparo de amostra, onde tornaria o analito mais concentrado na solução ao final da extração, a utilização de vácuo na extração em fase sólida seria necessária apesar de seus pontos negativos.

## REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

- [1] MAPA. Site do Ministério da Agricultura: Bovinos e Bubalinos. Disponível em: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acesso em: 25 de Maio de **2014**.
- [2] OAIEGEN, RP. Tese de Doutorado. Porto Alegre, Agosto de **2010**.
- [3] SIEVERS, G; ALOCILLA, A. Determinación de resistencia antihelmíntica frente a ivermectina de nematodos del bovino en dos predios del sur de Chile. *Arch. med. vet.*, Valdivia , v. 39, n. 1, **2007** .
- [4] COSTA, FM; NETTO, ADP. *Quim Nova* . **2012**. 616
- [5] CAPANEMA, LXL; VELASCO, LOM; SOUZA, JOB; NOGUTI, MB. *BNDES Setorial*. **2007**. 157
- [6] SILVA, HC. Tese de Doutorado. **2008**. 121 p.
- [7] CAMPILO, N; VIÑAS, P; FERÉZ-MELGAREGO, G; HERNADEZ-CÓRDOBA, M. *J. Chromatogr. A*. **2013**. 20
- [8] SEIXAS, JN; PEIXOTO, PV; ARMIÉN, AG; JABOR, FF; BRITO, MF. *Pesq. Vet. Bras*. **2006**. 161
- [9] IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002/2003. Rio de Janeiro. **2004**. 278
- [10] BRASIL. Guia Alimentar para a População Brasileira: Versão para consulta pública. Ministério da Saúde. **2014**. 46
- [11] SILVA, PHF. *Rev Quim Nova na Escola*. **1997**
- [12] ANVISA. Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos expostos ao consumo. Brasília. **2003**. 9
- [13] BRASIL. Lei nº 12.689 de 19 de Julho de 2012. Presidência da República. **2012**.
- [14] JESUS, DA. Dissertação de Mestrado. **2007**. 140 p.

- [15] SCHENCK, FJ; LAGMAN, LH. *Journal of AOAC International*, USA, volume 82, **1999**.
- [16] OMURA, S; IKEDA, H; ISHIKAWA, J; HANAMOTO, A; TAKAHASHI, C; SJINOSE, M; TAKAHASHI, Y; HORIKAWA, H; NAKAZAWA, H; OSONOE, T; KIKUCHI, H; SHIBA, T; SAKAKI, Y; HATTORI, M. *PNAS*, Japão, 98, 21. **2001**.
- [17] ALVINERIE, M; SUTRA, JF; GALTIER, P. *Ann. Rech, Vét. França*, 24. **1993**.
- [18] PEREZ, L. et al. *Arch. Med. Vet. Valdivia*, 38, 2. **2006**.
- [19] CIONE, APP; SILVA, PM. *Rev Analytica*, São Paulo, 32, 32. **2008**.
- [20] VICTORIA, J. *Dermatol. Pediatr. Lat. Colombia*, 1, 1. **2003**.
- [21] SIDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal. Site: [www.sidan.org.br](http://www.sidan.org.br). Acesso em: 24 de Junho de **2014**.
- [22] NETTO, DP. Et al. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. 27, 1. **2005**.
- [23] FAO. WHO *Technical Report Series – 911*. Geneva, **2002**. Disponível em: [whqlibdoc.who.int](http://whqlibdoc.who.int). Acesso em: 24 de Junho de 2014.
- [24] PRESTES, OD; MARTINS, ML; FRIGGI, CA; MUNARETTO, JS; ADAIME, MB; ZANELLA, R. *Quim. Nova*. 36, 5. **2013**. 13p
- [25] MAPA. PNCRC Animal. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. Ministério da Agricultura. **2014**.
- [26] BRASIL. Lei nº 9.782 de 26 de Janeiro de 1999. Presidência da República. **1999**.
- [27] MAPA. Instrução Normativa nº 13 de 29 de Maio de 2014. Publicada no Diário Oficial da União de 30 de Maio de **2014**, Seção 1, Página 55. Acesso em: 10 de Junho de 2014.
- [28] JESUS, D.A. Dissertação de Mestrado. Setor de Ciências Exatas. Universidade Federal do Paraná. **2007**.
- [29] SOUZA, SVC; LIMA, JA; TEODORO, JC; JUNQUEIRA, RG. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 27, 2007.

[30] ANVISA. PAMVet – Relatório dos anos de 2006 e 2007. Publicado em 2009. **2009.**

[31] INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia. DOQ-CGCRE-008 – Revisão 4 – Jul/2011. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos. Rio de Janeiro. **2011.**

[32] CASSIANO, NM; et al. *Quim Nova*, **2009**, 32, 1021.

[33] INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia. DOQ-CGCRE-008 – Revisão 3 – Fev/2010. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos. **2010.**