

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
DOUTORADO EM HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO  
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

**FABIO MACEDO DA COSTA**

**DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE  
METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE  
RESÍDUOS DE LACTONAS MACROCÍCLICAS EM  
MANTEIGA**

**NITERÓI, RJ  
2015**

**FABIO MACEDO DA COSTA**

**DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA  
ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE LACTONAS  
MACROCÍCLICAS EM MANTEIGA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ELIANE TEIXEIRA MÁRSICO  
Coorientador: Prof. Dr. ANNIBAL DUARTE PEREIRA NETTO

NITERÓI, RJ  
2015

C837d Costa, Fabio Macedo da

Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia analítica para determinação de resíduos de lactonas macrocíclicas em manteiga / Fabio Macedo da Costa; orientadora Eliane Teixeira Mársico. – 2015.

140 f.

Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal Fluminense, 2015.

Orientadora: Eliane Teixeira Mársico

1. Manteiga. 2. Análise de alimentos. 3. Lactonas. 4. Produto lácteo. 5. Resíduo de medicamento. I. Título.

CDD 637.1276

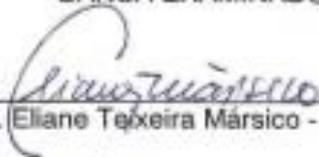
FABIO MACEDO DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA  
ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE LACTONAS  
MACROCÍCLICAS EM MANTEIGA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

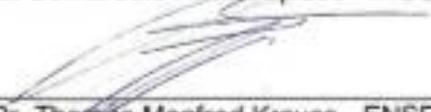
Aprovado em 27 de Fevereiro de 2015

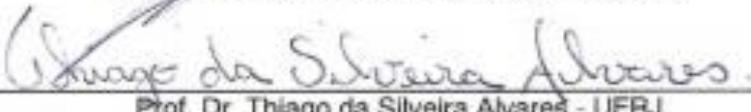
BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Eliane Teixeira Mársico - Orientadora - UFF

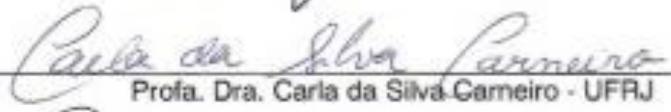
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Annibal Duarte Pereira Netto - Coorientador - UFF

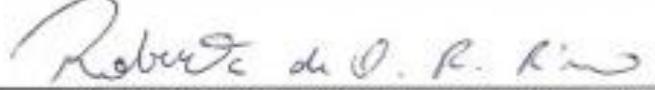
  
\_\_\_\_\_  
Dra. Bernardete Ferraz Spisso - INCQS/FIOCRUZ

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Thomas Manfred Krauss - ENSP/FIOCRUZ

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Thiago da Silveira Alvares - UFRJ

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Adam Conte Junior - UFF

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Carla da Silva Carneiro - UFRJ

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Roberta de Oliveira Resende Ribeiro - PNPd/CAPES

Niterói, RJ  
2015

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por ter me permitido chegar até aqui.

Agradeço aos meus orientadores, Professores Annibal Duarte Pereira Netto e Eliane Teixeira Mársico pelo acompanhamento de minha trajetória profissional desde o início de minha graduação, e pela fundamental orientação nesse importante projeto.

Agradeço aos membros da Banca Examinadora pela presteza em participar e contribuir com esse trabalho, em época tão atípica.

Agradeço em especial a Bernardete Ferraz Spisso, grande motivadora para essa caminhada.

Agradeço aos inúmeros amigos, colegas, e pessoas que agora nem teria condições de listar, e que a cada dia renovaram meu ânimo e inspiraram a confiança necessária para seguir.

Agradeço a CAPES pela contribuição financeira para a realização deste projeto.

## RESUMO

Lactonas macrocíclicas (LM) são uma família de substâncias comumente utilizadas em formulações de medicamentos para o tratamento de parasitas em espécies animais criadas para produção de alimentos. No Brasil, com exceção de formulações com efeitos a longo prazo (longa meia-vida), as LM estão registradas para uso em bovinos. Devido às suas propriedades lipofílicas e notável estabilidade, o uso indiscriminado de LM pode resultar na presença de resíduos no leite e produtos lácteos. Um método analítico foi desenvolvido e validado para a determinação simultânea de quatro LM (abamectina (ABA), doramectina (DOR), ivermectina (IVM) e moxidectina (MOX)) em manteiga, utilizando cromatografia a líquido com detecção por fluorescência. O método envolveu extração líquido-líquido sob aquecimento e uma mistura de acetonitrila, acetato de etila e água, com pré-concentração e derivatização, para produzir derivados fluorescentes estáveis. O tempo de corrida cromatográfica foi <12,5 min, com excelente separação. A validação do método seguiu recomendações internacionais, empregou amostras fortificadas de manteiga e as figuras de mérito obtidas foram satisfatórias para a aplicação desejada. O método foi também aplicado a 38 amostras de manteiga adquiridas na região metropolitana do Rio de Janeiro, RJ, Brasil, entre junho e setembro de 2013, analisadas em triplicata. IVM foi detectada em 89,5% das amostras, com concentrações entre 0,3 e 119,4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ; 76,3% das amostras continha DOR (0,6-64,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e 55,2% continham ABA (0,7-4,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). A maioria das amostras (76,3%) continham mais de uma LM e não foram detectados resíduos de MOX. Os resultados mostraram que o método desenvolvido provou ser simples, fácil e adequado para a determinação simultânea de resíduos de LM em manteiga. No nosso conhecimento, este é o primeiro método descrito para a avaliação de LM em matriz incomum como manteiga. Para as amostras de manteiga comercial avaliadas, os resultados indicaram uma alta incidência de avermectinas, portanto, esse produto lácteo com elevado teor de gordura poderia ser incluído nos programas oficiais de monitoramento com relação a resíduos de LM, pois concentra fortemente estas substâncias.

**Palavras chave:** lactonas macrocíclicas; resíduos de fármacos veterinários; produtos lácteos; CLAE-FLUO; análise de manteiga.

## ABSTRACT

Macrocyclic lactones (ML) are a family of compounds that are commonly used in drug formulations for the treatment of parasites in cattle. In Brazil, except for formulations with long-term effects, ML are registered for use in beef cattle and dairy cows. Indiscriminate use of ML may result in the presence of residues in milk and dairy products, due to their lipophilic properties and excellent stability. An analytical method was developed and validated for the simultaneous determination of four macrocyclic lactones (ML) (abamectin (ABA), doramectin (DOR), ivermectin (IVM) and moxidectin (MOX)) in butter, using liquid chromatography with fluorescence detection. The method employed heated liquid-liquid extraction and a mixture of acetonitrile, ethyl acetate and water, with preconcentration and derivatization, to produce stable fluorescent derivatives. The chromatographic run time was <12.5 min, with excellent separation. The method validation followed international guidelines and employed fortified butter samples and the figures of merit obtained were satisfactory for the desired application. The method was also applied to 38 samples of commercial butter purchased in the metropolitan area of Rio de Janeiro, RJ, Brazil between June and September 2013, and analyzed in independent triplicates. IVM was detected in 89.5% of the samples, with concentrations between 0.3 and 119.4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ; 76.3% of the samples contained DOR (0.6 to 64.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and 55.2% of them contained ABA (0.7 to 4.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Most samples (76.3 %) contained more than one ML; no residues of MOX were detected. The results showed that the method proved to be simple, easy and appropriate for simultaneous determination of ML residues in butter. To our knowledge, this is the first method described for the evaluation of ML in butter, an unusual matrix. For evaluated commercial butter samples, the results showed a high incidence of avermectins in the samples, and indicated that butter, a fatty dairy product should be screened by official monitoring programs for ML residues, because it strongly concentrates these compounds.

**Key words:** macrocyclic lactones; veterinary drug residue; dairy product; HPLC-FLUO; method validation; butter analysis.

## SUMÁRIO

**1 INTRODUÇÃO**, p. 12

**2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**, p. 15

2.1 BOVINOCULTURA LEITEIRA NO BRASIL, p. 15

2.2 EMPREGO DE ANTIPARASITÁRIOS DE USO VETERINÁRIO EM BOVINOCULTURA, p. 16

2.3 LACTONAS MACROCÍCLICAS, p. 17

2.4 DIRETRIZES INTERNACIONAIS QUANTO AO CONTROLE DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS DE USO VETERINÁRIO, p. 21

2.5 RESÍDUOS DE LACTONAS MACROCÍCLICAS EM LEITE, p. 23

2.6 MONITORAMENTOS OFICIAIS E INVESTIGAÇÃO DE LACTONAS MACROCÍCLICAS NO BRASIL, p. 26

2.7 DETERMINAÇÃO DE LACTONAS MACROCÍCLICAS EM PRODUTOS LÁCTEOS, p. 29

2.8 METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE LACTONAS MACROCÍCLICAS EM LEITE E DERIVADOS LÁCTEOS, p. 29

2.9 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS EM ALIMENTOS, p. 34

**3 DESENVOLVIMENTO**, p. 39

3.1 ARTIGO 1: Development and validation of a method for the determination of low–ppb levels of macrocyclic lactones in butter, using HPLC–fluorescence. Publicado no Periódico: *Food Chemistry*, p. 41

3.2 ARTIGO 2: Short Communication: Macrocyclic lactone residues in butter from Brazilian markets. Publicado no Periódico: *Journal of Dairy Science*, p. 72

3.3 ARTIGO 3: Resíduos de lactonas macrocíclicas em leite e derivados: propriedades físico-químicas, ocorrência, monitoramento e métodos analíticos (Artigo de revisão de literatura). Manuscrito a ser submetido ao Periódico: *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, p. 93

**4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**, p. 136

**5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, p. 137

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCRVDF	<i>Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods</i>
$C_{m\acute{a}x}$	Concentração Plasmática Máxima
CVMP	<i>Committee for Veterinary Medicinal Products</i>
DMFS	Dispersão de Matriz em Fase Sólida
EFS	Extração em Fase Sólida
ELL	Extração Líquido-Líquido
EM	Espectrometria de Massas
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FS	Fator de Segurança
IDA	Ingestão Diária Aceitável
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
LM	Lactonas macrocíclicas
LMR	Limite Máximo de Resíduo
$\mu\text{g L}^{-1}$	Micrograma por litro
$\mu\text{g kg}^{-1}$	Micrograma por quilo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i>
OMC	Organização Mundial do Comércio
PAMVet	Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinário em Alimentos de Origem Animal
PBT	Purificação em Baixa Temperatura
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
RSD	Relative standard deviation
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
$T_{m\acute{a}x}$	Tempo requerido para concentração plasmática máxima
$T_{1/2}$	Meia-vida
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Estrutura química das avermectinas. Fonte: Adaptado de Danaher et al. (2006), p. 19
- Figura 2 Desenho experimental, p. 39

## ARTIGO 1

- Figure 1 Typical chromatograms of the macrocyclic lactone derivatives: (A) extract from a blank butter sample; (B) standard mixture of individual compounds at concentrations of  $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ ; (C) extract from a blank butter sample, fortified at concentrations of  $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Moxidectin (MOX), abamectin (ABA), doramectin (DOR) and ivermectin (IVM), p. 57

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

- Table 1 – Preliminary evaluation of recoveries of ivermectin (at  $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ ;  $n = 3$ ) employing different proportions of extraction solvents, p. 55
- Table 2 – Linear equations of the proposed method of liquid-chromatography with fluorescence detection (HPLC-Fluo) employed for the determination of the macrocyclic lactones studied in butter, p. 58
- Table 3 – Validation parameters for recoveries, and inter- and intraday precision of the optimized liquid-chromatography method, p. 60
- Table 4 – Marker residues, LOD, LOQ,  $CC_{\alpha}$  and  $CC_{\beta}$  obtained for the contaminants in butter using the optimized methodology, p. 62

### ARTIGO 2

- Table 1 – Validation data for determination of macrocyclic lactones in butter by the optimized liquid chromatographic method, p. 80
- Table 2 – Data for the calibration models of the proposed chromatographic method for determination of macrocyclic lactones in butter, p. 81
- Table 3 – Agreement between the concentrations of macrocyclic lactones, estimated using the linear and second-order polynomial models for butter analyses, p. 82
- Table 4 – Occurrence and levels of residues of macrocyclic lactones found in butter samples, p. 83

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o 5º maior produtor mundial de leite (FAO, 2014) apesar de significativa parcela (58%) da produção leiteira ter como origem pequenos produtores, organizados em estrutura familiar, pouco tecnificados, e com condições geralmente inadequadas para garantir o correto manejo de fezes, controle de pragas e o cumprimento das Boas Práticas Agropecuárias. No contexto de precária condição sanitária, e visando minimizar perdas econômicas, o emprego de fármacos antibióticos, quimioterápicos, e anti-parasitários, como, anti-helmínticos (endoparasiticidas), ectoparasiticidas (moléculas com atividade contra artrópodes como carrapatos, moscas, pulgas, berne, entre outros) e endectoparasiticidas (moléculas com propriedades mistas) revela-se frequente (EMBRAPA, 2010).

Sem a prescrição e orientação do Médico Veterinário pode ocorrer uso inadequado dos fármacos, com utilização de doses empíricas, por vias de administração diferentes da recomendada, extrapoladas para as diferentes espécies produtoras de alimentos, sem levar em consideração aspectos farmacológicos específicos (BRASIL, 1999).

Dentre os anti-parasitários, as moléculas da classe das lactonas macrocíclicas (LM) são as mais utilizadas na terapêutica dos animais de produção, incluindo ruminantes, suínos, aves e peixes. Esta classe de medicamentos apresenta atividade anti-helmíntica perante endoparasitos digestivos e pulmonares, e ainda atuam contra ectoparasitas (DANAHER et al., 2006).

Em ruminantes, as LM podem ser detectadas no leite por meses após a administração nos animais, permanecendo as formas excretadas nessa matriz inalteradas após os diversos tratamentos realizados no seu beneficiamento (IMPERIALE et al., 2009). Outro estudo aponta uma correlação positiva entre a concentração desses resíduos e a presença de sólidos do leite (IMPERIALE et al., 2004). Como nesta porção inclui-se a porção lipídica a manteiga, produto com teor mínimo de 80% de gordura, é uma matriz alimentar com potencial para concentração de analitos lipofílicos, como as LM.

Contudo, não há especificações para manteiga quanto a limites máximos de resíduo (LMR) para LM, ainda que existam legislações específicas para cada endectocida dessa classe (LMR) em leite, de acordo com cada país, bloco

econômico ou fórum internacional. Entretanto, mesmo que as concentrações da maioria dos resíduos químicos com possibilidade de serem detectadas nos produtos de origem animal sejam suficientemente baixos, a presença dos mesmos são indicativos do não cumprimento das Boas Práticas Agropecuárias, sugerindo que outros fármacos comumente empregados também possam estar presentes como resíduos (BRASIL, 1999).

Para determinação de LM em alimentos, as técnicas analíticas devem ser capazes de garantir sensibilidade suficiente para suportarem os valores de LMR estabelecidos. As técnicas oficialmente empregadas baseiam-se em métodos cromatográficos, especialmente cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência, principalmente pela elevada sensibilidade, custo mais baixo e ausência de efeitos de matriz (GALARINI et al., 2013; RÜBENSAM et al., 2011).

O sub-programa de monitoramento do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), tem avaliado regularmente resíduos de diversas classes, em diferentes matrizes e espécies animais, contudo não apresentam em seu escopo métodos analíticos para determinação de resíduos LM em derivados lácteos (BRASIL, 2014b).

Tratando-se de produtos de consumo regular e diário é essencial que sejam conhecidos os níveis de resíduos de fármacos usados durante a criação dos animais, especialmente aqueles que apresentam altos teores de gordura, como a manteiga, que pode concentrar espécies lipofílicas como as LM, pois ainda que não apresentem significativa toxicidade para os seres humanos, pelo não cumprimento das Boas Práticas Agropecuárias, podem sugerir a presença de outros resíduos de natureza hidrofóbica com potenciais tóxicos mais elevados.

O objetivo principal da tese foi desenvolver e otimizar metodologia simples, factível e robusta, suportada por critérios reconhecidos internacionalmente, para determinação de resíduos de LM em manteiga, buscando trazer contribuições inéditas sobre o potencial dessa matriz em concentrar resíduos de analitos amplamente empregados na pecuária nacional. Considerando-se que não existem métodos disponíveis para todas as combinações de resíduos de fármacos de uso veterinário, matrizes alimentícias e espécies animais, o desenvolvimento e a validação de um novo método analítico podem ser, em parte ou completamente,

utilizados pelas autoridades competentes no delineamento dos programas nacionais de monitoramento de resíduos. Objetivou-se ainda aplicar o método a amostras comerciais de diferentes procedências e níveis de fiscalização, para verificar a ocorrência e os níveis de resíduos de abamectina, doramectina, ivermectina e moxidectina neste alimento de origem animal, contribuindo com dados consistentes para a comunidade científica e real valor para a saúde pública.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 BOVINOCULTURA LEITEIRA NO BRASIL

Desde os primórdios da civilização, o leite tem sido muito utilizado na alimentação humana como fonte de proteína, gordura, energia e outros constituintes essenciais e, por oferecer uma equilibrada composição de nutrientes que resulta em elevado valor biológico, é considerado um dos mais completos alimentos *in natura* (TRONCO, 2008). Com a domesticação dos animais, tornou-se possível incluí-lo na dieta de seres humanos adultos (FENNEMA, 2010).

A pecuária leiteira é uma das atividades de maior tradição no meio rural brasileiro com aproximadamente 1,35 milhões de estabelecimentos produzindo leite de acordo com o último censo agropecuário (IBGE, 2006) atividade que envolvia à época, cerca de cinco milhões de pessoas.

O valor bruto da produção de leite em 2013 foi estimado em R\$ 22,9 bilhões contribuindo para movimentar, principalmente, a economia das pequenas e médias cidades brasileiras (BRASIL, 2014b).

O Brasil possui o segundo maior rebanho leiteiro do mundo, produzindo anualmente mais de 33 bilhões de litros de leite (FAO, 2014). O país é o maior produtor da América Latina, contribuindo com 39,2% da produção latino-americana de leite, e está posicionado entre os dez maiores produtores mundiais, ocupando a quinta posição, atrás apenas de países como China, Estados Unidos, Índia e Paquistão (FAO, 2014). O estado de Minas Gerais, localizado na Região Sudeste, tem a maior área dedicada à pecuária leiteira no Brasil, liderando a produção nacional (CERQUEIRA et al., 2014).

De acordo com dados publicados por de França et al. (2009) as pequenas propriedades familiares ocupavam 24% da área rural e eram responsáveis por 58% da oferta total de leite para consumo. A produção pelos pequenos produtores, organizados em estrutura familiar, normalmente é pouco tecnificada, com limitadas condições para garantir o correto manejo de fezes, controle de pragas e as Boas Práticas Agropecuárias (EMBRAPA, 2010).

A produção brasileira de leite vem crescendo a cada ano, porém grande parte desse crescimento se deve ao aumento do número de vacas ordenhadas, em torno

de 23,5 milhões de cabeças, e não ao aumento da produtividade (cerca de 1471 litros/vaca/ano). Em números relativos, no período de 10 anos, a produção total de leite cresceu quase 50%, enquanto a produtividade teve apenas crescimento de cerca de 23% (EMBRAPA, 2010).

No Brasil a maior parte da produção de leite é destinado ao consumo, que com estimativa de aproximadamente 170 litros de leite/habitante/ano, representa uma quantidade inferior aos 210 litros recomendados pelos órgãos de saúde nacionais e internacionais. Entretanto, tanto o consumo de leite como de produtos lácteos vêm aumentando gradativamente, como consequência do aumento da renda da população (IBGE, 2010).

O aumento na produção de leite brasileira tem direcionado a produção excedente para elaboração de derivados lácteos para o mercado externo que, aliado aos programas de sanidade e qualidade, tem exigido a excelência dos produtos lácteos nacionais. Diante disso, o Programa de Melhoria da Qualidade do Leite e o PNCRC são ferramentas essenciais do MAPA para garantir a qualidade e a segurança do leite fornecido à população brasileira e aos consumidores mundiais (BRASIL, 2009).

## 2.2 EMPREGO DE ANTIPARASITÁRIOS DE USO VETERINÁRIO EM BOVINOCULTURA

Devido ao clima tropical, o Brasil apresenta grande diversidade nas condições climáticas, com significativas variações de temperatura e períodos de chuva que influenciam o manejo dos animais e, conseqüentemente, a produção e a qualidade dos alimentos (PICININ et al., 2013). Este fator, aliado às precárias condições sanitárias, e visando minimizar perdas econômicas, estimulam o emprego de fármacos antibióticos, quimioterápicos, e anti-parasitários, como, anti-helmínticos (endoparasiticidas), ectoparasiticidas (moléculas com atividade contra artrópodes como carrapatos, moscas, pulgas, berne, entre outros) e endectoparasiticidas (moléculas com propriedades mistas) com uma frequência expressiva (EMBRAPA, 2010).

Uma vez que os parasitas dos animais estão entre as principais limitações da produção pecuária (WALL; MORGAN, 2009), os fármacos de uso veterinário com

propriedades antiparasitárias têm sido largamente utilizados para prevenção e tratamento de doenças do rebanho (DANAHER et al., 2006).

Segundo dados divulgados pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), o mercado farmacêutico veterinário brasileiro cresceu em média 10% ao ano, nos últimos cinco anos, alcançando cerca de R\$ 4 bilhões em 2013. Além apenas do segmento de vacinas, devido ao crescente alinhamento brasileira às normas sanitárias internacionais, dentre os produtos farmacêuticos, a classe dos antiparasitários apresentou a maior participação no mercado, com pouco mais de R\$ 990 milhões (~25%) do total comercializado, superando inclusive o faturamento do antimicrobianos, que alcançaram pouco mais de R\$ 633 milhões (~16%) (SINDAN, 2014).

As preparações farmacêuticas para ruminantes, onde estão incluídas àquelas a serem empregadas em vacas criadas para produção de leite, representam a maior parte do mercado (56,3%), seguidas das formulações para uso em aves (14,4%) e suínos (12,5%), ainda que essas espécies sejam extensivamente criadas no Brasil para atendimento aos mercados interno e externo. Dentre os continentes que mais consomem e utilizam medicamentos para saúde animal, destacam-se as Américas, que juntas detêm 46% deste mercado, seguido da Europa com 33% do segmento (SINDAN, 2014).

As Boas Práticas Veterinárias quanto ao uso de antiparasitários devem considerar, entre outros critérios, a real necessidade de emprego desses fármacos para determinado agravo; a categoria de animais a serem medicados; a via de administração mais adequada e o critério de seguir as prescrições definidas pelo fabricante quanto à dose, período de uso e período de retirada ou carência (CERQUEIRA et al., 2014)

### 2.3 LACTONAS MACROCÍCLICAS

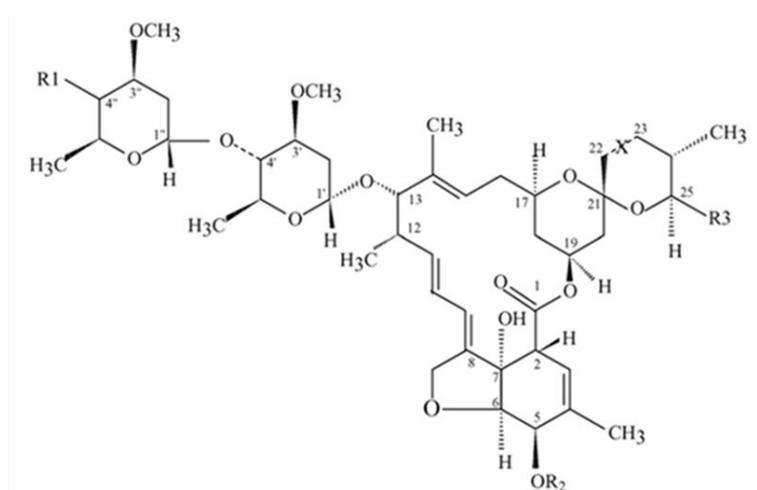
As LM representam uma classe de substâncias de origem natural ou semi-sintética com propriedades farmacológicas reconhecidas contra parasitas. Apresentam notória ação contra insetos, ácaros e helmintos, comuns causadores de verminoses digestivas e pulmonares nos animais de produção e responsáveis diretos de prejuízos na exploração zootécnica. Os mecanismos de ação como endo-

ou ectoparasiticida propostos para esta classe de fármacos se devem, em doses terapêuticas, à ligação a receptores glutamato e, em doses maiores, à ligação a receptores gabaérgicos, no entanto, ambos estão relacionados à inibição da contração muscular em organismos invertebrados. O fenômeno induz paralisia flácida da musculatura somática dos parasitas, incluindo da bomba faríngea, estrutura relacionada à alimentação e fixação à mucosa intestinal do animal. Do mecanismo resulta sua morte ou expulsão do organismo animal infestado. Atuam sobre formas maduras e imaturas e, em artrópodes, parece haver interferência na função reprodutiva (DANAHER et al., 2006).

O amplo emprego dessa classe de fármacos, justifica-se tanto pela efetiva ação contra os parasitas como pela baixa toxicidade apresentada em mamíferos. Em vertebrados, o local de ação localiza-se principalmente no sistema nervoso central e, nas baixas doses em que usualmente são empregadas contra os parasitas, pequena quantidade do fármaco consegue ultrapassar a barreira hematoencefálica e distribuir-se para esse local (MCKELLAR; BENCHAOUI, 1996).

Estruturalmente ocorrem como uma unidade macrocíclica formada por 16 estruturas, composta pela união de três grupos: o grupo hexahidrobenzofurano, um grupo dissacarídeo ao C-13 e um anel espiroquetal do C-17 a C-28 (MCKELLAR; BENCHAOUI, 1996) (Figura 1). São moléculas de elevado peso molecular e de natureza lipofílica, que apresentam boa dissolução na maioria dos solventes orgânicos (LANUSSE; PRICHARD, 1997).

As avermectinas são produzidas a partir da fermentação realizada pelo fungo *Streptomyces avermitilis*, originando naturalmente dois pares homólogos, Avermectinas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Diferem quanto ao radical ligado ao C-5, uma vez que a série A apresenta radical metil enquanto a série B apresenta grupamento hidroxila. Os subgrupos “1” apresentam dupla ligação entre C-22 e C-23, obtida pela desidratação do grupo hidroxila presente em C-23 dos sub-grupos “2”. Podem ainda serem sub-divididos em A<sub>1a</sub>, A<sub>2a</sub>, B<sub>1a</sub> e B<sub>2a</sub>, ao apresentarem como substituinte uma cadeia butil secundária na posição C-25 e, em componentes secundários, A<sub>1b</sub>, A<sub>2b</sub>, B<sub>1b</sub> e B<sub>2b</sub> quando apresentam como substituinte uma cadeia isopropil em C-25 (SPINOSA; GORNIK; BERNARDI, 2006).



Avermectina	R1	R2	R3	C <sub>22</sub> -X-C <sub>23</sub>
A <sub>1a</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH=CH-
A <sub>1b</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-CH=CH-
Avermectina B <sub>1a</sub>	OH	H	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH=CH-
Avermectina B <sub>1b</sub>	OH	H	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-CH=CH-
A <sub>2a</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CHOH-
A <sub>2b</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CHOH-
B <sub>2a</sub>	OH	H	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CHOH-
B <sub>2b</sub>	OH	H	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CHOH-
Doramectina	OH	H	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	-CH=CH-
Ivermectina B <sub>1a</sub>	OH	H	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH-

**Figura 1.** Estrutura química das avermectinas.

Fonte: Adaptado de Danaher et al. (2006)

Após purificação, apenas os isômeros da Avermectina B<sub>1</sub> (também referenciada como Abamectina) permanecem presentes, ocorrendo como os homólogos B<sub>1a</sub> (encontrado em maior quantidade) e B<sub>1b</sub> (encontrado em menor quantidade), mas apresentando a mesma atividade. A Ivermectina, é o derivado semi-sintético da Abamectina, produzido por saturação da dupla ligação entre C-22 e C-23, principal representante da classe, que assim como a Abamectina também deve ocorrer como uma mistura que não contenha menos que 80% do homólogo B<sub>1a</sub> e não mais de 20% de B<sub>1b</sub>. Por mutação genética, o fungo *Streptomyces avermitilis* pode também produzir Doramectina, outra avermectina, e que apresenta um radical ciclohexil em C-25 (DANAHER et al., 2006).

Já as Milbemicinas, como a Moxidectina, derivadas da fermentação de *Streptomyces hygroscopicus* ou *Streptomyces cyaneogriseus*, são estruturalmente semelhantes, compartilham do mesmo mecanismo de ação, mas não apresentam o dissacarídeo substituindo o anel macrolídeo verificado nas avermectinas (DANAHER

et al., 2012). Ainda que apresentem notória lipofilia, em função de diferenças nas estruturas e no peso molecular, podem apresentar diferentes coeficientes de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ) e, conseqüentemente, distinta solubilidade (PRICHARD; MÉNEZ; LESPINE, 2012).

Aspectos farmacocinéticos como absorção e distribuição, incluindo concentração plasmática máxima ( $C_{máx}$ ), tempo requerido necessário para alcançar a concentração máxima ( $T_{máx}$ ) e meia-vida ( $T_{1/2}$ ), dependem da via de administração empregada (oral, subcutânea ou tópica), dos veículos utilizados na formulação, das características físico-químicas próprias de cada lactona macrocíclica, das condições corporais dos animais medicados e da espécie a que pertencem (DANAHER et al., 2006).

Contudo, de forma geral caracterizam-se por serem moléculas persistentes no organismo animal, apresentam prolongados períodos de  $T_{1/2}$ , o que assegura a eficácia do fármaco contra os parasitas (MCKELLAR; BENCHAOUI, 1996; LANUSSE, 1997; KRAFT; DELAY; SINHA, 2003). Certas formulações de longa-ação podem persistir até 150 dias após aplicação em bovinos (CLEALE et al., 2004).

Acumulam-se no fígado, nos rins e tecido muscular, mas tendem a apresentar as maiores concentrações em tecidos adiposos, podendo constituir reservatórios nesses locais (LIFSCHITZ, 1999; CLEALE et al., 2004). Dessa maneira, maiores valores de  $T_{1/2}$  são verificados em animais obesos quando comparados com animais de produção mais magros (ALVINERIE, 2002; CRAVEN, 2002). Poucos metabólitos (cerca de 10%) de abamectina, doramectina e ivermectina são encontradas em amostras de fígado e tecido adiposo, ocorrendo a maior parte como moléculas não modificadas, que mantem sua natureza hidrofóbica (DANAHER et al., 2006). Mesmo a moxidectina apresentando maior taxa de metabolização quando comparada às avermectinas, também ocorre principalmente na forma original (PRICHARD; MENÉZ; LESPINE, 2012).

A excreção de formas inalteradas (EMA, 1997a; 1997b; 1999) ocorre predominantemente por via fecal (DANAHER et al., 2012), tanto que trabalhos têm dado destaque ao estudo de LM em fezes de animais (KOLAR et al., 2007; CELESTINA et al., 2010). Reforça o fato, o número de estudos que avaliam a ocorrência e os efeitos das avermectinas (notadamente abamectina e ivermectina), que após serem eliminadas pelas fezes dos animais, alcançam a água e sedimentos dos sistemas hídricos (TISLER; ERZEN, 2006; SANDERSON et al., 2007; BRINKE

et al., 2010), Nesses sistemas permanecem por semanas a meses, devido às suas baixas pressões de vapor e baixa solubilidade em água, implicando em baixa movimentação no meio ambiente (DANAHER et al., 2012).

#### 2.4 DIRETRIZES INTERNACIONAIS QUANTO AO CONTROLE DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS DE USO VETERINÁRIO

A Comissão do *Codex Alimentarius* é um órgão da *Food and Agriculture Organization* (FAO) e *World Health Organization* (WHO) e é responsável pela criação do *Codex Alimentarius*, um conjunto de normas alimentares designadas a todas as nações do mundo, reconhecido pela Organização Mundial do Comércio (OMC) como padrão de referência internacional para a segurança dos alimentos (BOTSOGLOU; FLETOURIS, 2001).

O *Codex Alimentarius* tornou-se referência no comércio internacional a partir de 1995, a partir da criação da OMC e do Acordo sobre Medidas Sanitárias e Fitossanitárias (Acordo SPS), tornando-se um poderoso instrumento na harmonização de normas para o comércio mundial de alimentos. A adesão ao Programa não significa obrigatoriamente a aceitação às normas e para cada norma aprovada, os países-membros são consultados sobre a sua aceitação ou não (ORTEGA; BORGES, 2012).

A Comissão do *Codex Alimentarius* que trata especificamente de resíduos de fármacos de uso veterinário em alimentos, *Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods* (CCRVDF), tem seus trabalhos acessorados pelo *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA). O JECFA é um comitê científico internacional de especialistas que se reúnem desde 1956 e atua na avaliação de risco de resíduos de fármacos de uso veterinário, contaminantes, toxinas naturais e aditivos alimentares nos alimentos.

Resíduos de fármacos de uso veterinário são, por definição, a fração da droga, seus metabólitos e/ou impurezas associadas à droga em qualquer parte comestível do alimento de origem animal. Existe uma determinada tolerância em relação à concentração de resíduos de fármacos de uso veterinário presentes em um produto de origem animal que não causaria danos à saúde do consumidor, o LMR.

Por definição, LMR é a concentração máxima de resíduos expressa em  $\mu\text{g kg}^{-1}$

ou  $\mu\text{g L}^{-1}$  e fixada pelo Comitê do *Codex Alimentarius* a ser legalmente permitida em um alimento (CODEX, 2013). O JECFA, a partir da avaliação de risco, recomenda valores de LMR ao CCRVDF (WHO, 2013).

Para a determinação do LMR, são considerados a análise toxicológica, a farmacocinética da substância e o risco que ela possa representar para a saúde humana. O risco é calculado por meio da Ingestão Diária Aceitável (IDA), expressa em mg ou  $\mu\text{g}$  do fármaco por kg de massa corporal, a partir do valor de *no observed adverse effect level* (NOAEL) – sem efeito observável – de uma substância, que consiste na maior dose de uma substância química que, se usada, não produz efeitos adversos na espécie testada mais sensível.

Ao valor de NOAEL, também se incorpora um fator de segurança de até 100 vezes em função das variações nos experimentos toxicológicos (FAO/WHO, 2000). A IDA é um valor estimado da quantidade máxima de um fármaco de uso veterinário em relação ao peso corporal humano que pode ser ingerida diariamente ao longo da vida do indivíduo sem lhe causar risco apreciável à saúde (WHO, 2003).

O valor de IDA toxicológico é baseado em uma série de avaliações de segurança toxicológicas relacionadas à exposição aguda e a longo prazo ao fármaco e seu impacto sobre a saúde. São levadas em consideração propriedades das substâncias principalmente com relação à ocorrência de carcinogenicidade, genotoxicidade, toxicidade reprodutiva, teratologia, neurotoxicidade, imunotoxicidade e alergenicidade, toxicidade ocular e toxicidade cardíaca (WHO, 2003).

Os LMR são dados importantes na determinação do período de carência de um fármaco, que consiste no intervalo de tempo em horas ou dias necessário para que as quantidades teciduais de resíduos ou de metabólitos da droga, presentes nos alimentos sejam inferiores aos LMR fixados pelo *Codex Alimentarius* para esse fármaco. No entanto, nem todas as substâncias utilizadas têm um LMR definido. Algumas não são consideradas perigosas, não tendo LMR, outras têm LMR provisórios e outras ainda são proibidas para o uso em animais (PEREIRA, 2009).

Como descrito por Spisso et al. (2010), além do JECFA, a avaliação de risco sobre fármacos e aditivos utilizados na alimentação animal na União Europeia é realizada pelo Comitê para Produtos Veterinários (*Comitee for Veterinary Medicinal Products* – CVMP) e pela Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority* - EFSA), respectivamente. O CVMP é órgão da Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency* - EMA), que é o

órgão responsável pelo estabelecimento de LMR de fármacos de uso veterinário na União Europeia.

LMR de resíduos de fármacos de uso veterinário devem ser estabelecidos tanto para tecidos relevantes dos animais, como por exemplo, músculo, gordura, pele, rim, fígado, bem como para produtos específicos tais como ovos, leite e mel, originários das espécies animais-alvo. Nessa condição um fármaco de uso veterinário poderá ser administrado de acordo com as boas práticas veterinárias. Contudo, se nenhum método de análise está disponível para fazer cumprir LMR a ser estabelecido para uma substância específica, nenhum LMR poderá ser estabelecido pelo Codex (CODEX, 2013).

## 2.5 RESÍDUOS DE LACTONAS MACROCÍCLICAS EM LEITE

A presença de resíduos em leite e derivados lácteos é motivo de grande preocupação, pois esses produtos podem conter resíduos de uma grande variedade de fármacos, que podem ser detectáveis de semanas a meses após o término do tratamento dos animais. A contaminação em leite e produtos lácteos pode ocorrer pelo uso indiscriminado de avermectinas e milbemicinas, quando não se cumprem as boas práticas agropecuárias (FURLANI et al., 2014). O epitélio da glândula mamária, como outras membranas biológicas, age com um barreira lipídica, e a alta hidrofobicidade das LM favorece a partição para o leite (PRICHARD; MÉNEZ; LESPINE, 2012) e, a excreção pelo leite representa uma importante via de eliminação para fármacos lipofílicos (IMPERIALE et al., 2004).

Diversos estudos de depleção descrevem as concentrações de LM em leite após administração desta classe de antiparasitários em doses recomendadas (BOGAN; MCKELLAR, 1988; TOUTAIN et al., 1988; ALVINERIE et al., 1993; ANASTASIO et al., 2002). Estudos com diversas espécies de ruminantes observaram que as concentrações de avermectinas em leite são semelhantes às verificadas no plasma (coeficientes de partição leite/plasma em torno de 1:1). Nesse contexto descreve-se como exceção o leite de ovelha, com concentrações 2,5 vezes maiores do que no plasma, possivelmente explicado pela concentração de lipídeos ser maior do que o verificado para outras espécies ruminantes (IMPERIALE et al., 2004).

Resíduos de ivermectina normalmente ocorrem em leite de ruminantes 1 hora e meia após os animais terem sido medicados (IMPERIALE et al., 2004), atingindo  $C_{\text{máx}}$  entre o segundo e o terceiro dia na maioria das espécies (a maior concentração foi observada em leite de vaca =  $41 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e puderam ser detectados entre 21 e até 29 dias após o término do tratamento (ALVINERIE et al., 1993; ANASTASIO et al., 2002; CERKNEVIK, 2002; CERKVENIK et al., 2004). Após administração de formulação contendo abamectina por via subcutânea, resíduos desta avermectina alcançaram  $C_{\text{máx}}$  em leite ( $26,8 \mu\text{g L}^{-1}$ ) no segundo dia, sendo detectados até o vigésimo terceiro dia após tratamento (CERKVENIK-FLAJS et al., 2003).

Valores ainda maiores foram verificados em estudos com doramectina. No terceiro dia após o tratamento por via subcutânea foi encontrada a maior  $C_{\text{máx}}$  residual desse analito em leite,  $79,8 \mu\text{g L}^{-1}$ , diminuindo gradualmente, mas podendo ser detectada por até 30 dias (IMPERIALE, 2003). Estudos realizados por Cerkvenik-flajs et al. (2005), também verificaram a presença de doramectina por até 37 dias após tratamento, sendo verificada a  $C_{\text{máx}}$  de  $31 \mu\text{g L}^{-1}$ , também no terceiro dia. Os autores concluíram que a  $T_{1/2}$  da doramectina é 1,6 vezes maior do que o verificado para abamectina e ivermectina em leite.

A lipofilicidade apresentada pela moxidectina é maior do que verificado para as avermectinas, garantindo ampla distribuição tecidual (BOUSQUET-MELOU et al., 2004) e resultando em coeficientes de partição leite/plasma maiores do que os verificados para as avermectinas, variando entre 4,2 e 18,5 (PRICHARD; MÉNEZ; LESPINE, 2012), com os maiores valores sendo verificados em leite de ovelha (IMPERIALE et al., 2004). Para esta milbemicina, em vacas leiteiras, que receberam medicação tópica (*pour-on*) foi verificada  $C_{\text{máx}}$  de  $34 \mu\text{g L}^{-1}$  após o quinto dia de tratamento (EMA, 2001).

Ainda há estudos verificando a estabilidade das LM em função do processamento tecnológico, uma vez que o leite é usualmente tratado por diferentes processos industriais para garantia de consumo seguro e elaboração de derivados. Cerkvenik et al. (2001) e Imperiale et al. (2009) verificaram a estabilidade dos analitos perante aos diferentes procedimentos de aquecimento convencionais em laticínios ( $65^{\circ}\text{C}$  por 30 min,  $75^{\circ}\text{C}$  por 15 s) ou fervura ( $100^{\circ}\text{C}$  por 10 s). Nesse estudo os autores não constataram nenhuma evidência de alteração química, com recuperações próximas a 100% após o tratamento, concluindo que essas moléculas não são afetadas pelo tratamento térmico e que tanto o leite cru como o processado

podem ser utilizados para estimativa de suas concentrações (ESCRIBANO et al., 2012).

Condições de congelamento também foram estudadas, armazenando amostras de leite por períodos prolongados. Os autores verificaram que os resíduos permaneceram estáveis após um ano de armazenamento, apresentando redução de 25% nas concentrações apenas após dois anos, mantidos em temperatura de -20°C (CERKVENIK et al., 2001). Também foram estudados os possíveis efeitos das condições típicas de elaboração de produtos lácteos fermentados e, mesmo em valores de pH entre 4,0 e 4,6, após produção de ácido láctico por diferentes culturas inoculadas, não foi verificada qualquer alteração em suas moléculas, bem como também não influenciaram o processo de fermentação (CERKVENIK et al., 2004).

Considerando os estudos abordados, é possível compreender o forte potencial para ocorrência desses resíduos em leite, justificando a elaboração de legislações, publicadas por diversos países, com vistas a garantir a qualidade e evitar não conformidades. Na Europa, produtos contendo ivermectina para uso injetável subcutâneo tiveram o período de carência estabelecido em 49 dias (EMA, 2009), e para aplicação tópica (*pour-on*) de 28 dias, Nos Estados Unidos, são estabelecidos períodos de carência de 35, 48 e 180 dias para administração subcutânea, tópica e oral, respectivamente (FDA, 2014). Os produtores devem estar atentos a esses períodos para prevenir resíduos nas amostras de leite, uma vez que é proibido aproveitar para consumo humano o leite de animais que estejam em tratamento ou tenham sido tratados com formulações contendo LM.

No Brasil, nas bulas das formulações de avermectinas para uso em animais de produção registradas no MAPA, há explícita contra indicação quanto ao uso em vacas que estejam produzindo leite para consumo humano (SINDAN, 2014). Esse tipo de informação deixa evidente a utilização indevida desses produtos tanto pelo Médico Veterinário como pelo produtor, podendo resultar no risco de haver níveis elevados de resíduos no leite, deixando o consumidor exposto a essas substâncias. Ainda, pela Instrução Normativa nº 13, de 29 de maio de 2014, o MAPA proibiu a fabricação, manipulação, fracionamento, comercialização, importação e uso de produtos antiparasitários de longa ação que contenham como princípios ativos as LM para uso veterinário em todos os animais, até que promova estudos a respeito do assunto (BRASIL, 2014c).

## 2.6 MONITORAMENTOS OFICIAIS E INVESTIGAÇÃO DE LACTONAS MACROCÍCLICAS NO BRASIL

Com o objetivo de proteger os consumidores e garantir as práticas comerciais, resíduos de LM são monitorados em alimentos por organismos oficiais, usando para tal os LMR legalmente estabelecidos. Para verificar a conformidade em relação a esses valores e também para avaliar a exposição do consumidor aos resíduos, são vigentes dois planos de monitoramento (BRASIL, 1986; BRASIL, 2003).

Um deles, o PNCRC, realizado pela Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), do MAPA, foi instituído em 1986 (BRASIL, 1986), alterado em 1999, com o objetivo de verificar o uso correto e seguro dos medicamentos veterinários, de acordo com as boas práticas veterinárias e com tecnologias utilizadas nos processos de incrementação da produção e produtividade pecuária. O Plano comporta um esforço governamental no sentido de ofertar aos consumidores alimentos seguros e competitivos (BRASIL, 1999).

Dentro do escopo dos alimentos de origem animal o Plano se propõe a monitorar resíduos de diversas classes de contaminantes em diversas matrizes da produção primária como leite, carnes, pescado, ovos e mel (BRASIL, 2014b). Atualmente, no Brasil, existem 1.437 estabelecimentos que produzem leite e derivados registrados sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal (SIF) e a partir desses estabelecimentos são coletadas as amostras a serem oficialmente analisadas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, para a presença de resíduos (BRASIL, 2014d). Com relação aos endectocidas estudados, apenas são verificados oficialmente em matrizes como carnes e leite.

O segundo, o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet), foi desenvolvido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a partir de recomendações originárias de um fórum de discussão provido pela autarquia entre 2000 e 2001 (BRASIL, 2000). O objetivo do programa foi controlar e fiscalizar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, tendo como matriz de análise leite bovino, contudo, nesse caso, com foco no produto exposto ao consumidor.

Durante o desenvolvimento de planos de controle de resíduos, importantes

critérios são utilizados para escolhas dos analitos a serem monitorados, tais como o potencial da substância em deixar resíduo; o potencial de exposição da população ao resíduo, referenciado pelos hábitos alimentares, poder aquisitivo, sistemas de criação e tecnologias empregadas na produção/processamento de alimentos; potencial do mal emprego dos fármacos, especialmente quanto ao uso correto de medicamentos veterinários (indicação, dose, via de administração, período de carência) e; disponibilidade de metodologias analíticas adequadas, confiáveis, exeqüíveis e compatíveis com os recursos laboratoriais disponíveis (BRASIL, 1999). Uma vez que as LM estão presentes nos sub-programas de monitoramento (BRASIL, 2014b), fica patente que seu estudo reveste-se de fundamental importância.

No âmbito do PNCRC, são comportados os sub-programas de monitoramento, investigação, exploratório e de controle de produtos importados. Anualmente são publicados os planejamentos dos sub-programas de monitoramento, incluindo as matrizes a serem analisadas por espécie animal, os analitos dentro de cada grupo, bem como os limites de referência estabelecidos e o número de amostras a serem coletadas (BRASIL, 2014b), e os resultados referentes ao monitoramento no ano anterior (BRASIL, 2014a). Para o ano de 2014, foram previstas análises de 150 amostras de leite bovino para investigação de resíduos de LM (BRASIL, 2014b), número inferior às 192 amostras de leite analisadas com relação aos mesmos analitos em 2013 (BRASIL, 2014a).

Pelo monitoramento do MAPA, os relatórios dos últimos 5 anos indicam que foram analisadas 640 amostras de leite bovino cru, e todas apresentaram-se em conformidade com a legislação (resíduos não detectados ou abaixo do LMR) para os resíduos de LM. Para a matriz leite, os LMR usados como referência pelo MAPA no PNCRC são de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  para abamectina, ivermectina e moxidectina e de  $15 \mu\text{g L}^{-1}$  para doramectina (BRASIL, 2010; BRASIL, 2011; BRASIL, 2012; BRASIL, 2013; BRASIL, 2014b).

Com relação ao monitoramento da ANVISA, o último relatório do PAMVet disponibilizado publicamente indica a análise de 603 amostras de leite processado (465 de leite integral fluido *ultra high temperature* (UHT) e 138 de leite integral em pó), apenas para avermectinas. Para esta matriz, os LMR usados como referência foram de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  para abamectina,  $15 \mu\text{g L}^{-1}$  para doramectina e de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  para ivermectina, todos estes com base no *Codex Alimentarius*. A técnica analítica para

quantificação dessas moléculas empregou cromatografia líquida de alta eficiência utilizando detectores de fluorescência (BRASIL, 2009).

Os resultados indicam que o número de amostras de leite que apresentaram resíduos de avermectinas foi muito maior que o número de amostras que apresentaram resíduos de antimicrobianos. O número de amostras de leite UHT com resíduos, ou seja, que considerou o somatório de todas as amostras que apresentaram resíduos quantificáveis ou não (Limites de Detecção =  $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$  e Limites de Quantificação =  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), é de 192 amostras, o que representa 41,29% do total de amostras e, para leite em pó, de 52,17%, 72 amostras. Da mesma forma no período anterior, 2004/2005, a detecção de resíduos de avermectinas foi grande, com 55,35% (leite UHT) e 63,33% (leite em pó) de amostras apresentando resíduos, sendo Minas Gerais o estado com maior número absoluto de amostras contaminadas, e o estado do Rio de Janeiro como o destaque em números relativos (%). A ivermectina foi o antiparasitário mais comumente encontrado nas amostras, seguido da doramectina e, finalmente, da abamectina (BRASIL, 2009).

De acordo com dados apresentados por recente revisão de literatura (Pacheco-Silva et al., 2014), ainda que não tenham sido publicados pela ANVISA, 711 amostras de leite (incluindo leite UHT, leite em pó e leite pasteurizado) foram analisadas em 2009/2010 também no âmbito do PAMVet. Ainda que em menor ocorrência que em períodos anteriores, as avermectinas foram novamente os principais analitos detectados, com destaque para a ivermectina, o resíduo mais comumente encontrado, seguido da doramectina. Em termos percentuais, 39,6% das amostras de leite em pó continham resíduos dessa classe de antiparasitários, seguidas das amostras de leite UHT (33%) e, finalmente, de 17% das amostras de leite pasteurizado contaminadas.

Com relação às pesquisas na área, alguns autores estudaram a presença de LM em leite no Brasil. Em 2006, Lobato et al. (2006), empregando cromatografia a líquido acoplada a detector de fluorescência verificaram presença de ivermectina acima do limite de quantificação ( $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em 17,8% das amostras de leite ( $n = 168$ ) expostas ao consumo, sem que nenhuma estivesse acima do LMR ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) para esta avermectina. Kolberg et al. (2009) avaliaram 10 amostras de leite (5 amostras de leite cru e 5 amostras de leite pasteurizado obtidas no comércio) e foi verificada a presença de abamectina em uma amostra ( $4,9 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e de ivermectina em outra amostra ( $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ), ambas de leite cru. Empregando a técnica de

cromatografia a líquido acoplada a detector de fluorescência os limites de quantificação para abamectina e doramectina foram respectivamente de  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Vinte amostras de leite integral e duas amostras de leite cru obtidas de produtores foram analisadas por Rübensam et al. (2011) após validação de metodologia para determinação de LM. Empregando detector de fluorescência, apenas uma amostra apresentou resíduos de doramectina, contudo, abaixo do limite de detecção do método ( $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Recentemente, pesquisadores do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) avaliaram 13 marcas de leite UHT e 8 marcas de leite pasteurizado adquiridas em supermercados de Campinas, São Paulo, para resíduos desses endectocidas, e apenas uma dentre as 238 amostras analisadas apresentou resíduos de moxidectina ( $2,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ), muito abaixo de seu LMR ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (FURLANI et al., 2014).

## 2.7 DETERMINAÇÃO DE LACTONAS MACROCÍCLICAS EM PRODUTOS LÁCTEOS

À despeito dos inúmeros estudos e monitoramentos realizados em leite, são escassos os estudos tanto de cunho analítico como de monitoramentos em derivados lácteos, como queijo, soro, coalho (coágulo) e iogurte (DANAHER et al., 2012; ESCRIBANO et al., 2012). Contudo, os dados disponíveis na literatura evidenciam correlação linear entre as concentrações de LM, teor de gordura do leite e sólidos totais (CERKVENIK et al., 2004), que podem variar durante o período da lactação mas que podem sugerir um potencial problema em derivados lácteos que apresentam maior concentração da porção lipídica.

Altas concentrações de LM foram verificadas no coalho (IMPERIALE et al., 2004), massa obtida após coagulação das proteínas do leite para obtenção do queijo. Durante a dessoragem, há significativa redução no teor de água do produto, implicando na concentração de proteínas e gordura e, conseqüentemente, dos resíduos de substâncias lipofílicas. Ainda que no soro possa ser eliminada certa quantidade de resíduos, o baixo coeficiente de partição soro/leite (0,16) garante que, ao final, os níveis residuais de LM sejam mais elevados em queijos do que no leite. A concentração desses analitos em queijos foi 3 à 4 vezes maior do que nas amostras de leite empregados para sua elaboração (ANASTASIO et al., 2002;

IMPERIALE et al., 2004). A conclusão de importante grupo de pesquisadores da área é que deve-se evitar prioritariamente o emprego do leite obtido de animais tratados com LM para produção de produtos lácteos gordurosos, mais do que quando direcionado para elaboração de derivados com baixos teores de gordura (CERKVENIK et al., 2004).

Com relação à produtos lácteos fermentados, Furlani et al. (2014) estudaram resíduos de avermectinas e moxidectina em amostras comerciais de iogurte, sem especificação do teor de gordura, adquiridos em supermercados da cidade de Campinas, São Paulo, Brasil. Foram analisadas 13 diferentes marcas, totalizando 104 amostras, e nenhuma delas apresentou resíduos dos antiparasitários pesquisados.

Contudo, não há disponível nenhum estudo visando determinação de LM em produtos lácteos com elevados teores de gordura como creme de leite ou manteiga, sub produtos onde a porção lipídica é a mais significativa quantitativamente. Pela legislação brasileira, entende-se por manteiga o produto gorduroso obtido exclusivamente pela bateção e malaxagem, com ou sem modificação biológica do creme pasteurizado derivado exclusivamente do leite de vaca, por processos tecnologicamente adequados. A matéria gorda da manteiga deverá estar composta exclusivamente de gordura láctea (BRASIL, 1996).

Segundo os padrões do *Codex Alimentarius*, a manteiga é um produto gorduroso derivado exclusivamente de leite e/ou produtos obtidos do leite, principalmente na forma de uma emulsão do tipo água em óleo (CODEX, 2010). O teor mínimo de gordura láctea do produto deve ser de 80%, enquanto os valores de umidade e sólidos não gordurosos devem ser de no máximo 16% e 2%, respectivamente, permitindo-se ainda adição de até 2% de sal em caso de manteigas salgadas (BRASIL, 1996; CODEX, 2010). A hipótese é que, em se tratando de analitos com reconhecida lipofilia, há expectativa de que essa matriz láctea gordurosa concentre de maneira pronunciada resíduos de LM.

## 2.8 METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE LACTONAS MACROCÍCLICAS EM LEITE E DERIVADOS LÁCTEOS

O preparo da amostras é a etapa que envolve o processo de extração dos

resíduos de uma amostra e a subsequente purificação do extrato para isolar os analitos de interesse e remover os interferentes de matriz que podem afetar o sistema de detecção. Mesmo com os avanços verificados nas técnicas de separação e detecção, a preparação da amostra ainda é crucial para garantia da performance instrumental e obtenção de resultados confiáveis. Em geral, o preparo de amostras em análises de resíduos não é comumente discutido na literatura, pois muitos trabalhos de revisão focam nos sistemas de detecção (KINSELLA et al., 2009a).

A maioria dos estudos para determinação de LM em leite e derivados lácteos são baseadas na extração com acetonitrila (KOLBERG et al., 2009; CERKVENIK-FLAJS et al., 2010; GIANETTI et al., 2011; RÜBENSAM et al., 2011; FURLANI et al., 2014) ou misturas de acetonitrila com água (IMPERIALE et al., 2004; PÉREZ et al., 2006). A acetonitrila é um solvente orgânico de grande interesse pois favorece a precipitação de proteínas, quando estas estão presentes nas amostras, com baixa extração de lipídeos (DANAHER et al., 2012). Enquanto a extração de amostras mais fluidas como leite, soro ou iogurte são geralmente conseguidas após simples agitação, com emprego de mesa agitadora, vórtex, ou banho ultrasônico, amostras sólidas requerem que a matriz seja previamente dispersa com o auxílio de um processador de alimentos (CERKVENIK et al., 2004). Para a purificação dos extratos os trabalhos mais recentes empregaram cartuchos (C<sub>8</sub> ou C<sub>18</sub>) para extração em fase sólida (EFS) (DURDEN; WOTSKE, 2009; CERKVENIK-FLAJS et al., 2010) enquanto outros apenas extração líquido-líquido (ELL) (RÜBENSAM et al., 2011; GIANETTI et al., 2011; FURLANI et al., 2014), todavia considerando o fato de que parte das LM poderiam precipitar juntamente com as proteínas do leite (RÜBENSAM et al., 2011).

Em estudos com piretróides, carrapaticidas com características lipofílicas amplamente utilizados nas criações animais, foi possível a determinação de cipermetrina e deltametrina em leite e bebidas lácteas (GOULART et al., 2008) e manteiga (MARTHE et al., 2010) após purificação em baixa temperatura (PBT) associada à ELL ou dispersão de matriz em fase sólida (DMFS), respectivamente. A técnica consiste no acondicionamento das amostras, após a respectiva extração, em temperatura igual ou inferior à -20°C, por 6 à 12 horas, para que se obtenha uma fase orgânica superficial contendo os solventes orgânicos e os analitos de interesse e, uma fase inferior congelada, contendo constituintes da matriz e água. Os solventes orgânicos empregados nesses experimentos foram acetonitrila e acetato

de etila (GOULART et al., 2008; MARTHE et al., 2010). Contudo, normalmente as técnicas empregadas para extração de resíduos de matrizes alimentícias gordurosas são trabalhosas e envolvem muitas etapas de purificação, podendo levar a perda dos analitos de interesse (BEYER; BIZIUK, 2008; GILBERT-LÓPEZ; GARCÍA-REYES; MOLINA-DÍAZ, 2009), que geralmente já ocorrem em baixas concentrações.

Com relação aos métodos de separação, aqueles que empregam cromatografia à líquido de alta eficiência são os mais efetivos na determinação de LM. Podem ser empregados detectores de ultravioleta (UV), de fluorescência ou de espectrometria de massas (EM). A detecção com sistema de UV se mostra robusta e útil para determinações quantitativas desses analitos em preparações farmacêuticas (da COSTA; PEREIRA NETTO, 2012) e rações para animais (DANAHER et al., 2012), podendo ser realizada análise direta após os procedimentos de extração, contudo sem especificidade e alta sensibilidade. Para análises nas quais os resíduos ocorrem em baixas concentrações (frações de  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), como em plasma e alimentos, o emprego do detector de fluorescência garante a seletividade e a sensibilidade requeridas (DANAHER et al., 2012), sendo preferido ao detector de UV para essas finalidades analíticas.

Entretanto, as moléculas de LM não apresentam fluorescência naturalmente, sendo necessário que os extratos sejam previamente derivatizados antes da injeção no sistema cromatográfico. A derivatização envolve a reação dos analitos com reagentes não-fluorescentes para produção de derivados fluorescentes (DANAHER et al., 2012). Um grande número de reações foram propostas para esta finalidade, contudo, haviam problemas na estabilidade dos derivados e na reprodutibilidade dos resultados, além do longo tempo reacional e da necessidade de condições extremas para a ocorrência das mesmas (TOLAN, 1980; KIJAK, 1992; PAYNE et al., 1997; ALI et al., 2000; DANAHER et al., 2001; POLLMEIER et al., 2002; NAGATA et al., 2003).

Em 2007, Berendsen, Mulder e Van Rhijn publicaram estudo sob o ponto de vista de química orgânica com descrição minuciosa da reação de derivatização e sua aplicação em amostras de leite. Nesta publicação foram divulgadas novas condições experimentais que garantiram velocidade, reprodutibilidade e robustez para derivatização e análise de todas as avermectinas e milbemicinas estudadas. Além de anidrido trifluoroacético e N-metilimidazol, que já eram empregados em

protocolos anteriores, foram adicionados ácido trifluoroacético e trietilamina, com incubação subsequente a 70°C por 30 minutos. Os derivados apresentaram-se estáveis por 80 horas na temperatura do laboratório e o limite de detecção de 0,1 µg kg<sup>-1</sup> foi obtido para todos os analitos testados nas condições otimizadas (BERENDSEN; MULDER; VAN RHIJN, 2007).

O autor também citou o trabalho de Turnipseed et al. (2005) afirmando que a determinação de LM empregando detector de fluorescência é superior à detecção empregando espectrometria de massas com relação aos limites de detecção e quantificação (BERENDSEN; MULDER; VAN RHIJN, 2007). Rübensam et al. (2011) também verificaram que a análise desses resíduos em amostras de leite empregando detector de fluorescência apresentaram valores menores com relação ao limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão e capacidade de detecção quando comparados à detecção empregando EM.

Muitos efeitos de matriz (relacionados a etapa de ionização) e altos valores para os coeficientes de variação (2,6 a 19,8%) foram verificados quando empregada técnica de separação acoplada a EM, sugerindo-se que esta seria interessante apenas para confirmação dos resíduos, enquanto que a determinação empregando detector de fluorescência (coeficientes de variação entre 2,9 e 8,8%) parecia mais adequada para distinguir e quantificar resíduos de avermectinas e milbemicinas. Os valores de recuperação foram de 100,2 a 105% empregando detector de fluorescência e de 101,2 a 141,6% quando utilizada EM (RÜBENSAM et al., 2011). Recentemente, outro trabalho (GALARINI et al., 2013) apontou que mesmo que os métodos envolvendo EM sejam amplamente utilizados não parecem ser superiores aos verificados com as técnicas empregando detector de fluorescência, especialmente por sua elevada sensibilidade, baixo custo e ausência de efeitos de matriz.

O mesmo entendimento é discutido na publicação de Danaher et al. (2012), ao concordarem que muitos métodos baseados em cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a EM têm sido desenvolvidos para LM, no entanto, parecem ser mais confiáveis com respeito à confirmação do que com relação à sensibilidade e quantificação. Nesses trabalhos diferentes fontes de ionização foram empregadas, como fotoionização à pressão atmosférica em modo negativo (APPI-) (TURNIPSEED et al., 2005), ionização por eletrospray em modo positivo (ESI+) (SHERIDAN; DESJARDINS, 2006; HE et al., 2009; ORTELLI et al., 2009;

GARRIDO-FRENICH et al., 2010), ionização por eletrospray em modo negativo (ESI-) (DURDEN, 2007; DURDEN; WOTSKE, 2009), ionização química à pressão atmosférica em modo positivo (APCI+) (KROGH et al., 2008) e ionização química à pressão atmosférica em modo negativo (APCI-). Entretanto o modo mais aplicado é aquele que utiliza fonte de ionização por eletrospray em modo positivo (ESI+) com análise de massas por triplo quadrupolo (EM/EM) ou por tempo de voo (TOF) (DANAHER et al., 2012).

Diversas metodologias analíticas têm sido desenvolvidas para detecção de diversas classes de resíduos de fármacos veterinários em alimentos de origem animal, mas por não serem confirmatórios e pela alta variabilidade dos resultados podem ser usados apenas para monitoramento (*screening*) (DANAHER et al., 2012).

Pela Diretiva 23/1996 da Comunidade Européia (EC, 1996), as LM estão relacionadas como substâncias do grupo B (fármacos veterinários), como anti helmínticos. De acordo com a Decisão 657/2002 da Comunidade Européia, técnicas analíticas confirmatórias para as LM, devem prover identificação evidente com relação a estrutura química dos analitos (EC, 2002). Técnicas adequadas são cromatografia a líquido com detecção por espectrometria de massas, cromatografia a líquido com detecção por UV, empregando pelo menos duas colunas diferentes ou cromatografia a líquido acoplada a detector de fluorescência, uma vez que passam a exibir fluorescência após serem derivatizadas (EC, 2002). Nesse sentido, a determinação de resíduos de LM em manteiga, empregando detector de fluorescência, provem análise quantitativa dos analitos e, adicionalmente, satisfaz aos critérios de confirmação da Comunidade Européia.

## 2.9 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS EM ALIMENTOS

Os documentos de maior relevância e também os mais citados em pesquisas com relação à verificação da performance para validação de métodos analíticos empregados para determinação de resíduos de fármacos de uso veterinário em alimentos são os documentos publicados em 2002, pela Comunidade Européia (EC, 2002) e pelo *Codex Alimentarius*, em 2009 (CODEX, 2009).

A Decisão 657/2002 apresenta os requisitos para a validação de métodos

analíticos para resíduos de substâncias farmacologicamente ativas a fim de assegurar uma aplicação harmonizada da Diretiva 23/1996/CE relativa ao desempenho de métodos analíticos para ser utilizado na análise de amostras oficiais e da interpretação dos resultados analíticos para essas amostras (EC, 2002). Países que não fazem parte da União Européia não são obrigados a validar seus métodos de acordo com os padrões europeus, e podem, por exemplo, utilizar outros modelos para a validação de métodos analíticos, como as orientações do *Codex Alimentarius* (DANAHER et al., 2012).

A publicação do *Codex Alimentarius* apresenta as diretrizes para delineamento e implementação de programas nacionais para verificação da conformidade dos alimentos relacionada ao uso de fármacos veterinários em animais que produzem alimentos para consumo humano (CODEX, 2009).

Os documentos recomendam que os métodos analíticos a serem desenvolvidos devem ser adequados para emprego rotineiro pelas autoridades competentes para verificação de todos os resíduos de fármacos veterinários possíveis de ocorrer nas principais *commodities* alimentícias. Os métodos desenvolvidos poderão ser empregados para estudos de prevalência em programas de monitoramento, para estimativa de ingestão dos contaminantes pelos consumidores e para determinação de todas as possíveis combinações de substâncias/matrizes/espécies animais que ainda não têm LMR estabelecidos (CODEX, 2009).

Os atributos a serem considerados na avaliação da performance dos métodos analíticos para determinação de resíduos dependem primeiramente da intenção do método, ou seja, se foram desenvolvidos para simplesmente detectar os analitos (*screening*), para quantificá-los (métodos quantitativos) ou para confirmar sua presença (métodos confirmatórios), seguidos de requisitos também extremamente relevantes como exatidão, precisão e sensibilidade (CODEX, 2009).

Destaca-se também nos documentos a importância da seletividade, que se relaciona com a habilidade do método em relacionar de maneira inequívoca a resposta do detector exclusivamente aos analitos de interesse, discriminando-o de substâncias de natureza semelhante como componentes da matriz, substâncias endógenas ou produtos de degradação, característica fundamental para métodos confirmatórios (EC, 2002; CODEX, 2009).

Ao desenvolver um método, aconselha-se inicialmente definir os analitos de

interesse, escolhidos de acordo com critérios utilizados pelos planos oficiais de controle de resíduos; definição da matriz, usualmente da produção primária como tecidos, leite, mel e ovos; e a faixa de concentração que o método pretende ser aplicado. O analito a ser investigado pode ser a molécula na forma original, seu principal metabólito, a soma de ambos ou um produto de reação formado durante a etapa analítica. Contudo, importa que, sempre que possível, o resíduo a ser determinado provenha evidência inequívoca da exposição ao fármaco pelo consumo da matriz alimentícia analisada. Em geral, a matriz a ser analisada deve ser selecionada pelo seu potencial em acumular os resíduos de interesse. Por exemplo, pelas recomendações do *Codex Alimentarius*, para substâncias de natureza lipofílica deve-se preferir como matriz de análise o tecido adiposo (CODEX, 2009).

Com relação aos parâmetros exatidão e precisão há valores estabelecidos pelos dois documentos, notadamente para recuperação e precisão. Recuperação é o valor, expresso em porcentagem, relativo a quantidade do analito determinado após todas as etapas analíticas com relação ao valor que foi prévia e intencionalmente adicionado (fortificação) à amostras brancas em concentração conhecida. Formação de conjugados com constituintes da matriz após a fortificação, perdas durante as etapas de extração, bem como procedimentos para concentração dos extratos (típicos em análises de resíduos por ocorrerem em baixas concentrações) podem implicar em valores distintos de 100% (situação que representaria que a quantidade adicionada foi determinada em sua totalidade). Pelas recomendações do *Codex Alimentarius* (CODEX, 2009), para métodos que determinam resíduos na faixa de concentração entre 1 e 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , a média dos experimentos de recuperação (em cada nível testado) devem estar entre 60 e 120%, enquanto pela legislação europeia, os valores devem estar entre 70 e 110% (EC, 2002). Quando a faixa estudada estiver entre 10 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , são aceitos pelo *Codex Alimentarius* valores de recuperação entre 70 e 120% (CODEX, 2009), e pela União Europeia, para ensaios acima de 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  são tolerados valores entre 80 e 110% (EC, 2002).

No entanto, independente dos valores de recuperação, é desejável que os resultados estejam associados a baixa variabilidade, característica associada à precisão do método, normalmente expressa através de coeficientes de variação (CV) ou desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*), ambos expressos em porcentagem, que podem ser calculados pela seguinte fórmula:

$$\text{RSD (\%)} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média aritmética}} \cdot 100$$

Em procedimentos de validação intralaboratorial, a precisão deve ser determinada através de experimentos conduzidos em diferentes dias, com reagentes de lotes distintos, por diferentes analistas e, se possível, em equipamentos distintos (CODEX, 2009).

Pelo *Codex Alimentarius*, quando estudada a faixa de concentração entre 1 e 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  são tolerados valores de até 30% e, para níveis entre 10 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , de até 20% (CODEX, 2009). A legislação europeia não estabelece valores de coeficientes de variação para ensaios realizados em níveis abaixo de 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , apenas recomenda que sejam tão baixos quanto possíveis. Como referência, a partir de 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , o valor estabelecido por esta legislação deve ser de, no máximo, 23% (EC, 2002).

Métodos quantitativos são baseados em comparações da resposta do analito em uma amostra com a resposta de padrões do analito em soluções de concentrações conhecidas. Durante o desenvolvimento e validação de um método, deve se testar a resposta do detector em uma determinada faixa de concentrações. Recomenda-se utilizar no mínimo 5 pontos além do branco, cobrindo toda a faixa analítica de interesse, resultando em uma curva que se possa expressar estatisticamente (CODEX, 2009).

Uma vez que os limites de detecção e de quantificação estão diretamente relacionados com a sensibilidade do método analítico (PACHECO-SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014), a legislação europeia (EC, 2002) os substituiu por novos parâmetros de performance para interpretar os resultados referentes às não conformidades das amostras testadas, que são também utilizados pelo PNCRC. Devem ser calculados pelo procedimento indicado pela ISO 11843-2 (BS ISO, 2005). Tratam do domínio das concentrações e são: o limite de decisão ( $CC_{\alpha}$ ), que é definido como o limite a partir do qual pode ser concluído, com uma probabilidade de erro  $\alpha$ , que uma amostra é não conforme; e capacidade de detecção ( $CC_{\beta}$ ), que representa a menor quantidade da substância que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada em uma amostra com uma probabilidade de erro aceitável ( $\beta$ ) (DOVIDAUSKAS et al., 2013). Para substâncias com LMR estabelecidos,  $\alpha$  e  $\beta$  são

iguais a 5%, enquanto para substâncias sem LMR definido, o valores de  $\alpha$  e  $\beta$  serão, respectivamente, de 1% e 5% (EC, 2002).

### 3 DESENVOLVIMENTO

Este estudo teve início com o desenvolvimento de ensaios para otimização do método de extração de quatro LM (abamectina, doramectina, ivermectina e moxidectina) a partir de manteiga, com posterior desenvolvimento e otimização de condições cromatográficas para separação e determinação analítica dos moléculas de interesse, seguido de validação da metodologia em questão com base em parâmetros de seletividade, efeito de matriz, linearidade, exatidão (estudos de recuperação), acurácia (repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão e capacidade de detecção e estabilidade dos analitos, segundo recomendações internacionalmente reconhecidas.

A segunda etapa do doutoramento envolveu a aplicação da metodologia desenvolvida na verificação de ocorrência de resíduos de LM em amostras de manteiga expostas ao consumo de diferentes procedências obtidas no Estado do Rio de Janeiro, a fim de estimar a magnitude com que este produto lácteo concentra os resíduos de fármacos de uso veterinário estudados, e assim, inferir o cumprimento das Boas Práticas Agropecuárias na produção de leite. Todas as etapas envolvidas neste trabalho estão ilustradas na Figura 2.

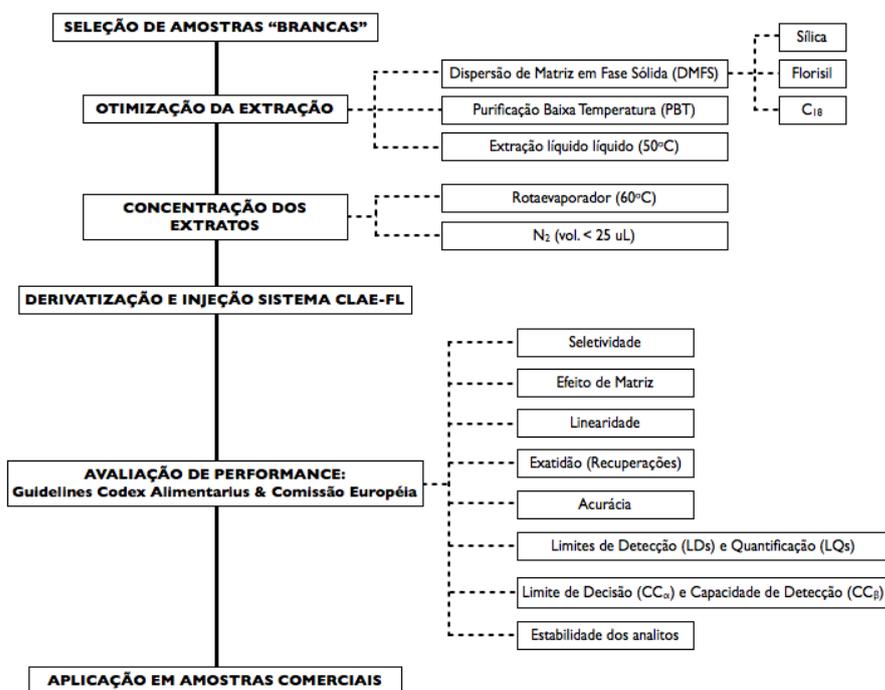


Figura 2. Desenho experimental.

Os resultados obtidos no presente trabalho encontram-se na forma de dois manuscritos que serão apresentados a seguir. O primeiro artigo que reporta a primeira etapa do doutoramento foi publicado no periódico *Food Chemistry* (Elsevier®) em Fevereiro de 2015. O segundo artigo referente à verificação de ocorrência de LM em amostras comerciais de manteiga por aplicação da metodologia foi publicado no periódico *Journal of Dairy Science (Official Journal of the American Dairy Science Association®)* em Abril de 2015. O terceiro artigo, que será submetido à Revista do Instituto Adolfo Lutz, procurou agregar evidências sobre o tema proposto buscando sintetizar a literatura com vistas a nortear o desenvolvimento de novos projetos e indicar novos rumos para futuras investigações.

Os artigos seguem abaixo. A formatação dos textos segue a norma de cada periódico.

3.1 ARTIGO 1: Development and validation of a method for the determination of low–ppb levels of macrocyclic lactones in butter, using HPLC–fluorescence. Publicado no Periódico: *Food Chemistry* (<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.046>)

**Running Title:** A method of HPLC–fluorescence for macrocyclic lactones in butter

Development and validation of a method for the determination of low–ppb levels of macrocyclic lactones in butter, using HPLC–fluorescence

Fabio Macedo<sup>a,b</sup>, Eliane Teixeira Marsico<sup>a</sup>, Carlos Adam Conte-Júnior<sup>a</sup>, Michele Fabri de Resende<sup>b,c</sup>, Taila Figueredo Brasil<sup>b</sup>, Annibal Duarte Pereira Netto<sup>b,c\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal Fluminense – Rua Vital Brazil Filho, nº 64, 24230–340, Santa Rosa, Niterói, RJ, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Química Analítica Fundamental e Aplicada – Departamento de Química Analítica – Instituto de Química – Universidade Federal Fluminense – Outeiro de São João Batista, s/n, 24020–141, Valonguinho, Centro, Niterói, RJ, Brazil

<sup>c</sup>Programa de Pós-Graduação em Química – Instituto de Química – Universidade Federal Fluminense – Outeiro de São João Batista. s/n – 24020–141, Valonguinho, Centro, Niterói, RJ, Brazil

Correspondence to:

Annibal Duarte Pereira Netto

[annibal@vm.uff.br](mailto:annibal@vm.uff.br)

PHONE: +55(21)2629-2355

FAX: +55(21)2629-2143

## Abstract

An analytical method was developed and validated for the simultaneous determination of four macrocyclic lactones (ML) (abamectin, doramectin, ivermectin and moxidectin) in butter, using liquid chromatography with fluorescence detection. The method employed heated liquid-liquid extraction and a mixture of acetonitrile, ethyl acetate and water, with preconcentration and derivatization, to produce stable fluorescent derivatives. The chromatographic run time was <12.5 min, with excellent separation. The method validation followed international guidelines and employed fortified butter samples. The figures of merit obtained, *e.g.* recovery (72.4 to 106.5%), repeatability (8.8%), within-laboratory reproducibility (15.7%) and limits of quantification (0.09 to 0.16  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) were satisfactory for the desired application. The application of the method to real samples showed that ML residues were present in six of the ten samples evaluated. The method proved to be simple, easy and appropriate for simultaneous determination of ML residues in butter. To our knowledge, this is the first method described for the evaluation of ML in butter.

### *Keywords:*

Avermectins; Veterinary drug residues; Dairy product; HPLC-fluorescence; Method validation; Butter analysis.

## 1. Introduction

The avermectins abamectin (ABA), doramectin (DOR) and ivermectin (IVM), and the milbemycin moxidectin (MOX) are macrocyclic lactones (ML) that are widely used to control parasitic infections in dairy cattle (Pereira, 2009). The occurrence of ML residues in milk and dairy products results from the topical application and oral or subcutaneous administration of these compounds to cattle (Gayard, Alvinerie, & Toutain, 1999). ML have a large, hydrophobic and complex ringed structure. The structure of avermectins consists of a 16-member macrocyclic ring containing a spiroketal group, a benzofuran ring and a disaccharide functionality. Milbemycins are structurally similar to avermectins, but they lack the disaccharide group (Danaher et al., 2006; Prichard, Ménez, & Lespine, 2012).

The avermectins are derived from fermentation products of the soil bacterium *Streptomyces avermitilis*. Avermectin B1, the predominant homologue, also known as abamectin (ABA), is the most important naturally produced compound. IVM and DOR result from synthetic modification of fermentation products. Milbemycins are derived from the fermentation of different soil bacteria, *S. hygroscopicus* or *S. cyaneogriseus*, and MOX results from a synthetic structural modification. Several aspects of the structural differences and the similarities of these compounds, biological activity and their mechanisms of action were recently reviewed (Prichard, Ménez, & Lespine, 2012). The synthetic modifications result in different characteristics among each group of compounds, which are reflected in their Kow values and consequently in the distribution between plasma and lipids. IVM shows a log Kow of 3.2 while the other compounds show values between 4.4 and 4.8, indicating high affinity to lipids and adipose tissue.

After cattle are medicated, ML residues may be present in milk due to their partitioning between plasma and milk, which is a function of lipophilic properties and

variables such as the drug formulation and the pharmacokinetics of each ML (McManaman & Neville, 2003; Danaher et al., 2006). Because mammals excrete large amounts of ML in their feces, only part the parent ML is transferred to milk, after they are mobilized from the adipose tissue. In terms of biotransformation, IVM was found to be 90% in the form of the parent drug in mammals (feces and tissues) (Danaher et al., 2006), while 85–99% of ABA residues were in the parent form in goats (muscle, milk and feces) (European Medicines Agency, 1999). A fraction of 67–92% of DOR was found as residues in sheep (fat, liver, kidney and muscle) (European Medicines Agency, 1997) and the parent moxidectin (MOX) was found to be the major residue in cattle (fat, liver, kidney and muscle) (Danaher et al., 2006).

ML are persistent in animal bodies and milks. IVM residues were detectable in the plasma of ruminants for 20–60 days after treatment (Anastasio et al., 2002; Cerkvenik et al., 2002) and sheep milk showed ABA residues for 23 days post-treatment (Cerkvenik et al., 2003). Residual levels of DOR were detectable 30–37 days after treatment (Imperiale et al., 2003; Cerkvenik-Flajs et al., 2005) and milk showed residues of MOX at 10–13 days post-treatment (European Medicines Agency, 2001).

The thermal stability of ML is also high. Residues of IVM were stable under cooking conditions (microwave heating, frying or boiling) (Rose, Farrington, & Shearer, 1998) or in milk samples frozen for one year at  $-20^{\circ}\text{C}$  (Cerkvenik et al., 2001). IVM and MOX were stable under the conventional milk heating processes ( $65^{\circ}\text{C}$  for 30 min,  $75^{\circ}\text{C}$  for 15 s and  $100^{\circ}\text{C}$  for 10 s) that are widely used in the dairy industry (Imperiale et al., 2009; Cerkvenik et al., 2001).

High concentrations of IVM in milk are positively correlated with milk-fat content (Cerkvenik et al., 2004). The residual concentrations of IVM and MOX detected in cheese during the ripening period showed positive correlations with the percentages of water loss, total solids, and fat content (Cerkvenik et al., 2004; Imperiale et al., 2004). The European

Union (EU) prohibited the use of formulations containing ABA, DOR and IVM for dairy cows (EC, 2010) and established a withdrawal period of 49 days for medications containing IVM and administered to dairy cows by subcutaneous injection.

In order to assure that humans are not exposed to unsafe residue levels by consuming edible products obtained from treated animals, several governmental authorities have established maximum residue limits (MRL) or tolerance levels for veterinary drugs. The ML studied here, used for antiparasitic purposes, are included in Group B (veterinary drugs and contaminants) of Annex I to Council Directive 96/23/EC (EC, 1996). Only MOX has a MRL established in milk by Commission Regulation No. 37/2010 (EC, 2010). The marker residues are Avermectin B1a (ABA), Doramectin (DOR), 22,23-Dihydroavermectin B1a (IVM) and Moxidectin (MOX) (EC, 2010). The Codex Alimentarius (Codex, 2012) defined no MRL for ABA and MOX, indicating that these drugs should not be present in milk.

The analytical approaches used to detect residues of ML in food were reviewed by Danaher and colleagues (Danaher et al., 2006; Danaher et al., 2012). Methods of HPLC-UV can be used for the determination of IVM in medications (da Costa & Pereira Netto, 2012), but not in foods because these methods are insufficiently sensitive. Most methods for ML determination in foods are based on high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection (HPLC-Fluo) after reaction with trifluoroacetic anhydride (TFAA) and 1-methylimidazole (MI) (Berendsen, Mulder, & Van Rhijn, 2007; Cerkvenik-Flajs et al., 2010; Gianetti et al., 2011; Rubensam et al., 2011) to produce a fluorescent group. Fluorescence detection is a suitable confirmatory method for the drugs listed in Group B of Annex I to Council Directive 96/23/EC (EC, 2002) and it is possibly the most commonly used method to detect ML (Galarini et al., 2013; Turnipseed et al., 2005; Sheridan & Desjardins, 2006). Certain authors also consider that HPLC-Fluo is superior to HPLC-MS/MS to quantify ML, with respect to the achievable limits of detection (LOD) and quantification (LOQ)

(Turnipseed et al., 2005; Rubensam et al., 2011), and the decision limit ( $CC_{\alpha}$ ) and detection capability ( $CC_{\beta}$ ) (Rubensam et al., 2011).

To our knowledge, no publication has previously described the quantification of ML in butter or in high-fat milk products, despite the large number of studies that have quantified ML residues in milk and dairy products (Anastasio et al., 2002; Imperiale et al., 2003; Cerkvnik-Flajs et al., 2005; Lobato, Rath, & Reyes, 2006; Cerkvnik et al., 2001; Cerkvnik et al., 2004; Berendsen, Mulder, & Van Rhijn, 2007; Imperiale et al., 2009; Cerkvnik-Flajs et al., 2010; Gianetti et al., 2011; Rubensam et al., 2011; Galarini et al., 2013).

Butter is a fatty product derived exclusively from milk and/or milk products, mainly in the form of a water-oil emulsion, with a minimum milkfat content of 80% for unsalted (Codex, 2010) and salted samples (Brasil, 1996). The occurrence of veterinary drug residues in butter is of particular concern because this is an inexpensive, favored and widely consumed food; moreover, butter is not usually included in monitoring programs. Therefore, the development and validation of methods for determination of ML residues in butter are essential to assure the quality of this food.

The initial hypothesis of this study assumed that because of the lipophilic characteristics of ML, they would probably become concentrated in fatty dairy matrices such as butter. Therefore, the aim of this study was to develop and validate a method for determination of ABA, DOR, IVM and MOX in butter. One difficulty for this study is the lack of MRL for ML in butters and certified materials for ML in butter. This is doubtless a result of the lack of previous data on ML residues in this food.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Chemicals and reagents*

ABA, DOR, MOX (Fluka, Germany) and IVM (Sigma-Aldrich, MO, USA) were employed. Standard stock solutions of the individual ML ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) were prepared by dissolving 2 mg of each standard in 10 mL of acetonitrile. A working standard solution of each compound ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) was prepared by combining appropriate aliquots of each stock solution, and dilution using acetonitrile. The stock solutions were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in amber glass flasks and discarded one month after preparation.

Acetonitrile and ethyl acetate (HPLC grade) were purchased from TediaBrazil (RJ, Brazil). The derivatization reagents triethylamine (TEA), trifluoroacetic anhydride (TFAA) and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Sigma-Aldrich, and 1-methylimidazole (MI) was purchased from Fluka. Florisil (60-100 mesh), silica (230-400 mesh) and octadecylsilica were also obtained from Sigma-Aldrich (MO, USA). Ultrapure water was prepared in a Millipore Milli-Q system (Millipore, MA, USA), following reverse osmosis (Rios DI-3, Millipore).

Butter samples were purchased in supermarkets and represented the major brands available in the retail market of the cities of Niterói and Rio de Janeiro, Rio de Janeiro State, Brazil. In this state, the annual per capita consumption of butter is 0.303 kg (IBGE, 2010). Four imported butters from Argentina (2) and France (2), and six butters produced in Brazil were analyzed. All of them were purchased in July 2013, and according to the package labels were produced in May or June 2013. All butters were kept under refrigeration ( $4^{\circ}\text{C}$ ) until analysis.

To obtain the analytical samples, the refrigerated butter packages were removed from the refrigerator and kept in the laboratory for approximately 30 min until they reached ambient room temperature ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ), and unwrapped. Aliquots of the samples were taken from different parts of the butter, using a clean stainless-steel spatula, and mixed by pressing the

different aliquots in a clean glass beaker. Three aliquots of 0.5 g of each butter were taken, weighed and individually processed by the optimized extraction method described below (*Section 2.2*).

## *2.2. Sample extraction*

The first step of this study was the evaluation and optimization of the extraction conditions for the analytes from butter samples. The first aspect was the need to melt the sample at 50°C prior to the extraction, as shown elsewhere (Marthe et al., 2010) for the extraction of pyrethroids from butter. Melted butter samples were employed in all steps of this study, and the mixture of solvents used for the extraction was heated to this temperature to prevent the butter from solidifying after the solvent was added.

The parameters evaluated were: proportion of extraction solvents, sample mass (0.5 and 1.0 g) and heating time after addition of the extraction solvents. The solvents used were acetonitrile, ethyl acetate and water, initially in the proportion of 60:20:20 (v/v/v) respectively, as described for the extraction of pyrethroids from butter (Marthe et al., 2010). Because of the excellent solubility of the analytes in acetonitrile, other solvent proportions, especially increased proportions of this solvent (70:15:15; 70:10:20; 80:5:15; 80:10:10; 80:15:5 and 90:5:5; v/v/v) were tested to obtain better recoveries. After these initial tests, the proportion of acetonitrile was kept constant at 90% and different proportions of ethyl acetate and water (90:2:8; 90:3:7; 90:4:6; 90:5:5; 90:7:3 and 90:8:2, v/v/v) were evaluated. The initial aliquot of butter (0.5 or 1.0 g) was tested. After addition of the extraction solvents, different heating times (0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 25 and 30 min) were also studied with respect to recovery.

These studies led to a set of optimized conditions of heated liquid-liquid extraction. Aliquots of 0.5 g of butter were heated to their melting point (at 50°C), and 10 mL of a solution containing acetonitrile, ethyl acetate and water (90:4:6, v/v/v) was added at 50°C to the melted butter. The resulting mixture was vortex-mixed for 30 s and kept for 2 min in a water bath (50°C), vortex-mixed again, ultrasonically extracted for 10 min, cooled to the ambient laboratory temperature, and centrifuged at 6000 rpm (4226 g) for 10 min. The upper phase was removed and filtered through PTFE filters (0.45 µm, Agilent). The resulting solution was concentrated to < 500 µL in a rotary evaporator at 60°C and finally concentrated to near-dryness (< 25 µL) under gentle nitrogen flow.

### *2.3. Derivatization step*

The detection of ML using fluorescence requires a previous reaction to generate a fluorescent moiety. Derivatization of sample extracts and standard solutions was carried out as described elsewhere (Berendsen, Mulder, & Van Rhijn, 2007). Briefly, concentrated extracts or appropriate aliquots of the standard solutions were derivatized at room temperature after addition of 100 µL of a mixture of MI:ACN (1:1, v/v), 50 µL of TEA, 150 µL of a mixture of TFAA:ACN (1:2, v/v) and 50 µL of TFA. An exothermic reaction resulted, coloring the solution and releasing fumes. Finally, after dilution to 1 mL using acetonitrile, the mixture was briefly vortex-mixed, transferred to vials, heated at 70°C for 30 min, cooled to room temperature and injected into the HPLC-Fluo system. The derivatives are stable for at least 80 h when protected from daylight, as previously shown (Berendsen, Mulder, & Van Rhijn, 2007).

### *2.4. HPLC analysis*

Qualitative and quantitative analyses were performed using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-Fluo). The chromatographic system consisted of a vacuum degasser, quaternary pump, autosampler, column oven and fluorescence detector (all Agilent 1100 Series, USA), and was controlled by an Agilent ChemStation. The separations of ML were achieved using a Waters SunFire C8 column (150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m, Waters, USA) connected to a guard column (12.5 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) with the same characteristics. A gradient of acetonitrile (A) and water (B) at a flow rate of 1.2 mL min<sup>-1</sup> allowed the separation of the ML derivatives. The gradient started at 88% of A with a linear increase up to 97% of A in 8 min, which was then held constant for 4.5 min. The total run time was 12.5 min. An additional period of 5 min was necessary to re-establish the initial chromatographic conditions. The column temperature was 31°C and the injection volume was 20  $\mu$ L. The excitation and emission wavelengths were 365 nm and 470 nm respectively. The solvents were degassed in an ultrasonic bath prior to use.

### *2.5. Validation procedure*

The performance of the quantitative method used to determine ML residues in butter was established through a validation protocol that followed the criteria of the Codex Alimentarius (2009) and European Commission (2002). The parameters of selectivity, linearity, trueness (obtained through recovery studies), repeatability (intraday precision), within-laboratory reproducibility (interday and analysts' precision), limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), decision limit ( $CC_{\alpha}$ ), detection capability ( $CC_{\beta}$ ) and stability in matrix were evaluated.

The selectivity and specificity of the chromatographic method were investigated by analyzing a standard solution containing all derivatives at individual concentrations of  $4 \mu\text{g L}^{-1}$ , blank butter samples, and butter samples and extracts fortified with the analytes at the same concentration under within-laboratory reproducibility conditions.

Instrumental working ranges of individual ML were evaluated through analytical curves obtained by random injection of five concentration levels (0.8, 1.0, 2.0, 4.0 and  $6.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and a blank solution, in triplicate, as previously studied by Lagedo (2010). The linearity of the method was evaluated using matrix matched calibration (MMC) obtained using blank extracts spiked at the same concentrations. The parameters of the calibration lines and the correlation parameters between chromatographic peak areas and standard concentrations were obtained by the least-squares method. The ratios of the angular coefficients of the calibration lines obtained using solvent and matrix-matched calibration were used in the evaluation of matrix effects (Lopes et al., 2012).

The limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of each ML were obtained by dividing respectively 3 and 10 times the signal-to-noise ratios by the angular coefficients of the analytical curves obtained by MMC. Signal-to-noise ratios were estimated by the standard deviations of peak areas obtained after 7 subsequent injections of the  $0.8 \mu\text{g L}^{-1}$  standard.

The decision limits ( $CC_{\alpha}$ ) and the detection capabilities ( $CC_{\beta}$ ) were calculated as recommended by the European Commission Guidelines (2002) and based on a linear regression model by an overall analytical curve procedure from the same within-laboratory reproducibility data, according to BS ISO 11843-2 (2000). Blank butter samples were fortified at and above the lowest calibration level in equidistant steps.  $CC_{\alpha}$  were determined by plotting the measured signal against the added concentrations and calculating the corresponding concentration at the y-intercept plus 2.33 times the standard deviation of the

within-laboratory reproducibility of the intercept.  $CC_{\beta}$  was calculated as  $CC_{\alpha}$  plus 1.64 times the standard deviation of the within-laboratory reproducibility (European Commission, 2002). Ideally, blank samples should be representative of the population (Danaher et al., 2006).

Recovery and repeatability (intraday precision) were evaluated by analyzing portions of blank butters spiked at the same three concentration levels (2.0, 4.0 and 6.0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Seven replicates were measured in each experiment for each concentration. Repetitions of the entire procedure by the same technicians on three different days, and on a different day, by two different groups of technicians were used to evaluate the within-laboratory reproducibility.

Because no certified material containing the analytes in a butter matrix was available, the study of stability of the ML in the matrix was carried out using blank butter samples spiked at 4  $\mu\text{g kg}^{-1}$  analyzed in triplicate under the repeatability conditions. Part of the spiked samples were promptly extracted, derivatized and analyzed, but six aliquots of each sample stored at low temperatures ( $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  and  $-20^{\circ}\text{C}$ ) for 2 weeks before being processed and analyzed.

### **3. Results and discussion**

#### *3.1. Optimization of the extraction method*

The first method evaluated followed the extraction procedure of pyrethroids from butter (Marthe et al., 2010), which involves extraction at  $50^{\circ}\text{C}$  with the same solvents used in this study, and matrix solid-phase dispersion (MSPD) combined with purification at low temperature (PLT). The evaluation of adsorbents of different polarities (Silica, Florisil and Octadecylsilica) always led to ML recoveries lower than previously found for pyrethroids (Marthe et al., 2010). Furthermore, the extracts obtained after MSPD using Silica and Florisil

showed the presence of interfering materials (mainly fat), which reduced the efficiency of the derivatization reaction and could damage the chromatographic column. The use of Octadecylsilica, the adsorbent with the lowest polarity, led to clear extracts, but also to unsatisfactory recoveries. Moreover, the additional PLT period reduced the method throughput.

These partly negative results indicated the need to improve the conditions of liquid-liquid extraction of ML from butter, which was melted at 50°C in order to allow the best contact with the extraction mixture (Marthe et al., 2010). The solvent mixtures evaluated were always heated to 50°C, which is below the boiling points of the individual solvents, to prevent the butter from solidifying during the extraction.

The first step in the development of the method consisted of a preliminary evaluation of different proportions of acetonitrile, ethyl acetate and water to extract IVM in spiked butter samples. IVM was selected for this step of the study because it is the most common ML found in milk, due to its low price and commercial availability. Because of the high solubility of ML in acetonitrile, it was kept as the predominant solvent and a wide range of proportions (60 to 90%) was tested. Ethyl acetate, which interacts well with the lipid matrix, favoring analyte extraction, played an important role in the extraction mixture. A small proportion of water was necessary to assure phase partitioning. Some of the recovery results obtained during the evaluation of the solvent proportions are presented in Table 1. These results provided a starting point for the subsequent development of the extraction method.

**Table 1**

Preliminary evaluation of recoveries of ivermectin (at 4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ; n = 3) employing different proportions of extraction solvents.

Solvent proportions (%)			Recovery (%) <sup>a,b</sup>
Acetonitrile	Ethyl acetate	Water	
60	20	20	60.2 (8.0)
70	15	15	68.3 (6.3)
70	10	20	67.8 (7.7)
80	5	15	74.8 (5.0)
80	10	10	76.2 (4.0)
80	15	5	75.4 (6.1)
90	2	8	83.4 (3.1)
90	3	7	88.0 (3.2)
90	4	6	91.0 (3.2)
90	5	5	85.2 (4.6)
90	7	3	84.6 (4.7)
90	8	2	84.3 (4.1)

<sup>a</sup>The other ML were not evaluated in this experiment.

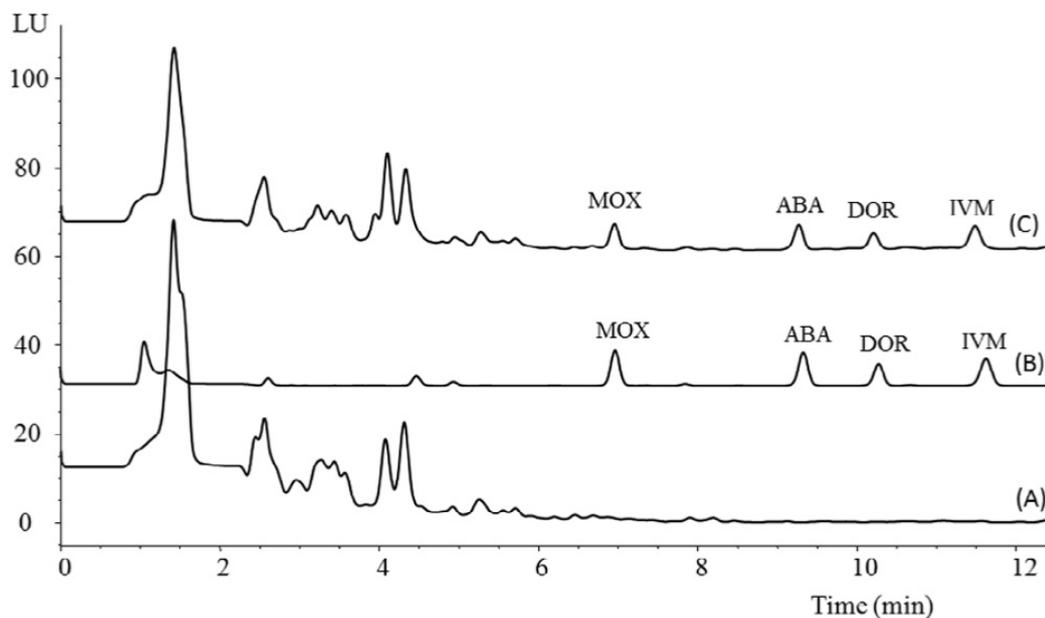
<sup>b</sup>The values between parentheses refer to relative standard deviations (RSD(%)).

The highest proportion of acetonitrile (90%) produced the highest recovery levels. The recovery was then optimized by varying the proportions of ethyl acetate and water, and was obtained using 4% (v/v) ethyl acetate and 6% (v/v) water. Therefore, the proportion of these solvents was set at 90:4:6 (v/v/v). The next step was the study of the heating time of the mixture obtained after addition of the extraction mixture to the sample. The best extraction

time was 2 min for all analytes. The recoveries (70 to 92%) obtained by extracting small amounts of sample (0.5 g) were higher than those obtained by extracting larger amounts of 1.0 g ( $\leq 70\%$ ). Finally, in order to further improve the sensitivity of the quantitative method, the extract was reduced to 500  $\mu\text{L}$  in a rotary evaporator and finally to around 25  $\mu\text{L}$  by a gentle nitrogen flow. The method developed had a short extraction time, employed relatively small solvent volumes and led to clean solutions after the derivatization step. Furthermore, the fluorescent derivatives showed good chromatographic resolution after extraction and derivatization.

### *3.2. Evaluation of the chromatographic separation*

The typical chromatograms presented in Fig. 1 allowed evaluation of the selectivity and specificity of the chromatographic method. The analysis of blank butter samples (Fig 1A) showed the absence of signals at the retention times of the analytes, obtained either in solvent solutions (Fig 1B) or in the matrix (Fig 1C). These results showed that the extracts were free of sources of chromatographic interference that would give rise to false-positive signals. A comparison of Figs. 1B and 1C showed no variation in retention times. Moreover, a relatively short analysis time (12.5 min), which resulted in very good resolution of consecutive peaks of derivatives, was obtained.



**Fig. 1.** Typical chromatograms of the macrocyclic lactone derivatives: (A) extract from a blank butter sample; (B) standard mixture of individual compounds at concentrations of  $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ ; (C) extract from a blank butter sample, fortified at concentrations of  $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Moxidectin (MOX), abamectin (ABA), doramectin (DOR) and ivermectin (IVM).

### 3.3. Method validation

Extracts of food samples may contain components that affect performance measurements and may increase or decrease the signal detector (Shah, Midha, & Findlay, 2000). The matrix effect on the analytical signals was evaluated, and the analytical curves were compared (*Section 2.5*).

Calibration curves of individual derivatives obtained in the solvent and the MMC showed excellent determination coefficients ( $R^2$ ) ( $\geq 0.998$ ). The residual plots showed no trends in this range of concentrations. The ratios of the slopes of the analytical curves obtained by MMC and in solvent solutions were 1.14, 0.87, 1.10 and 0.82 for ABA, DOR, IVM and MOX, respectively. Although a ratio of slopes ranging from 0.8 to 1.2 is acceptable

as evidence of discrete matrix effects (Lopes et al., 2012), MMC was employed as the calibration method in this study. This choice was made because of the lack of previous data for ML in butter. Consequently, it was necessary to detect the lowest possible concentrations of ML in butter, with the minimum possible bias. Table 2 summarizes the parameters of the calibration curves obtained by MMC.

**Table 2**

Linear equations of the proposed method of liquid-chromatography with fluorescence detection (HPLC-Fluo) employed for the determination of the macrocyclic lactones studied in butter.

Analytes	Concentration range ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Regression equation	Determination coefficients ( $R^2$ )
Abamectin	0.8 - 6.0	Peak area = 11.102 C - 3.9416	0.999
Doramectin	0.8 - 6.0	Peak area = 6.4762 C - 0.0573	0.998
Ivermectin	0.8 - 6.0	Peak area = 8.6512 C + 8.6627	0.998
Moxidectin	0.8 - 6.0	Peak area = 10.844 C + 9.9097	0.998

Trueness was evaluated through recovery studies, applying the extraction procedure and determination method described above. This procedure was adopted because of the lack of a certified material of ML in butter and of reference methods. The recovery results, obtained at 3 fortification levels (2.0, 4.0 and 6.0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) analyzed as 7 independent replicates, ranged between 72.4 and 106.5% for the assayed compounds at the 3 levels, and were all above 70% (Table 3). All recovery values met the performance criteria of acceptable limits of 60 to 120% for concentrations ranging from 1 to 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  established by the Codex Alimentarius (2009), and 70 to 110% as recommended by European Commission Decision 657 (2002), and

can therefore be considered satisfactory. The recoveries of ML from salted and unsalted butter samples showed no differences.

1 **Table 3**

2 Validation parameters for recoveries, and inter- and intraday precision of the optimized liquid-chromatography method.

Within-laboratory reproducibility									
Analytes	Recovery (%) <sup>a</sup>			Interday Precision (RSD(%)) <sup>b</sup>			Analyst Precision (RSD(%)) <sup>b</sup>		
	2 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	4 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	6 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	2 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>d</sup>	4 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>d</sup>	6 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>d</sup>	2 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>d</sup>	4 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>d</sup>	6 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>d</sup>
Abamectin	87.4 (7.2)	74.7 (2.9)	79.4 (2.5)	15.7	10.9	6.0	11.7	10.5	3.6
Doramectin	78.8 (7.5)	74.6 (7.0)	75.2 (6.7)	13.6	10.6	7.0	13.0	9.2	4.0
Ivermectin	106.5 (6.5)	91.0 (2.7)	84.6 (4.7)	11.3	12.7	12.2	14.0	7.5	9.2
Moxidectin	73.4 (8.8)	72.4 (3.6)	72.9 (7.1)	14.2	12.6	11.1	15.6	10.8	7.3

3 <sup>a</sup> Number of independent replicates = 7.4 <sup>b</sup> Number of independent replicates = 5.5 <sup>c</sup> Intraday precision given between parentheses as relative standard deviation (RSD(%)).6 <sup>d</sup> Interday and inter-analyst precision, given as relative standard deviation (RSD(%)).

7 The precision of the method was evaluated by performing repeatability (intraday precision)  
8 and within-laboratory reproducibility experiments. The method repeatability or intraday  
9 precision, expressed as relative standard deviation (RSD(%)) (European Commission, 2002),  
10 was performed simultaneously with the recovery evaluation (Table 3). The RSD(%) were  
11 lower than 7.5% for all levels assayed, except for moxidectin at the lowest level ( $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ),  
12 when a  $\text{RSD}(\%) = 8.8\%$  was found (Table 3).

13 The interday precision of the method (reproducibility) was performed by comparing the  
14 data obtained on 3 different days, by the same analyst. Fortified butter samples at the same  
15 levels ( $2.0$ ,  $4.0$  and  $6.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) were assayed (Table 3). RSD(%) values were below 16%,  
16 indicating good stability of the method. Two different analysts evaluated the within-laboratory  
17 reproducibility on one day (Table 3). At the levels of  $4$  and  $6 \mu\text{g kg}^{-1}$ , RSD(%) were below  
18 11% for all analytes, although they ranged between 11.7 and 15.6% for the lowest level. In  
19 methods used to support the Codex Maximum Residue Limit for Veterinary Drugs, RSD(%)  
20 up to 30% are accepted, at the working concentration range ( $1$  to  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) evaluated for  
21 these analytes (Codex, 2009). European Commission Decision (2002) does not specify  
22 RSD(%) for concentrations below  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ , but states that they should be as low as  
23 possible. All the precision studies showed good similarity among the values obtained in all  
24 experiments.

25 The LOD and LOQ are important parameters for an analytical method used to estimate  
26 residues in foodstuffs, especially when there is interest in monitoring residues that do not  
27 have established MRL (Codex, 2009). The LOD and LOQ were always below  $0.05 \mu\text{g kg}^{-1}$   
28 and  $0.16 \mu\text{g kg}^{-1}$  respectively (Table 4). These results indicate that the proposed method is  
29 sufficiently sensitive for trace analysis of ML in butter.

30  $\text{CC}_\alpha$  and  $\text{CC}_\beta$  allow estimation of the critical concentrations above which the method  
31 can distinguish and quantify a substance, taking into account the variability of the method and

32 the statistical risk of making a wrong decision (Lopes et al., 2012). The decision limit ( $CC_{\alpha}$ ) is  
 33 the lowest concentration of an unapproved contaminant that can be detected in a sample, with  
 34 a 1% chance of a false-positive decision. The detection capability ( $CC_{\beta}$ ) is the smallest  
 35 content of the analyte that can be detected, identified and/or quantified in a sample, with a 5%  
 36 chance of a false-negative decision (European Commission, 2002). Calculations of  $CC_{\alpha}$  and  
 37  $CC_{\beta}$  followed BS ISO 11843-2 (2000) (Table 4).  $CC_{\alpha}$  was determined by the corresponding  
 38 concentration at the y-intercept plus 2.33 times the standard deviation of the within-laboratory  
 39 reproducibility (European Commission, 2002). The values were below  $0.18 \mu\text{g kg}^{-1}$ , except  
 40 for DOR, which showed a value of  $0.22 \mu\text{g kg}^{-1}$ .  $CC_{\beta}$  was calculated as  $CC_{\alpha}$  plus 1.64 times  
 41 the standard deviation (European Commission, 2002). The highest values were obtained for  
 42 DOR ( $0.28 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) and IVM ( $0.25 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

43

44 **Table 4**

45 Marker residues, LOD, LOQ,  $CC_{\alpha}$  and  $CC_{\beta}$  obtained for the contaminants in butter using the  
 46 optimized methodology.

Analyte	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	$CC_{\alpha}$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	$CC_{\beta}$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>d</sup>
Abamectin	0.04	0.12	0.14	0.17
Doramectin	0.05	0.15	0.22	0.28
Ivermectin	0.05	0.16	0.18	0.25
Moxidectin	0.03	0.09	0.13	0.17

47 <sup>a</sup>LOD: limit of detection.48 <sup>b</sup>LOQ: limit of quantification.49 <sup>c</sup> $CC_{\alpha}$ : decision limit.50 <sup>d</sup> $CC_{\beta}$ : detection capability.

51

52 The last step of the validation procedure consisted of the evaluation of the stability of  
53 ML in butter extracts. Usually, the analyte stability is characterized under different storage  
54 conditions (European Commission, 2002). In this study, no differences in concentrations of  
55 the analytes were observed when comparing fresh solutions and fortified samples stored for  
56 two weeks at  $4 \pm 2$  °C or -20°C.

57

### 58 *3.3. Sample analysis*

59

60 Ten butter samples purchased in local supermarkets in Rio de Janeiro State were  
61 analyzed in triplicate by the methodology developed here. In order to ensure the quality of the  
62 results, when the proposed method was applied, an internal quality control that consisted of a  
63 blank spiked sample at  $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ , a reagent blank, and a blank sample were analyzed in  
64 parallel with the real samples. The retention times of the analytes detected were compared  
65 with those of corresponding calibration standards in the same batch, to confirm the identity of  
66 the analytes. All chromatograms were free from interferences. Traces of DOR and/or IVM  
67 were detected in six samples. IVM ( $1.2 - 6.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) was found in the six contaminated  
68 samples, and DOR was detected in three of these samples ( $2.2, 3.7$  and  $11.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). In this  
69 case, the extract of the most concentrated samples was diluted 1:1 with acetonitrile,  
70 derivatized and reanalyzed in a concentration covered by the proposed linear range ( $0.8 - 6.0$   
71  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

72

## 73 **4. Conclusions**

74

75 A simple, inexpensive, reproducible and highly sensitive multiresidue method was  
76 developed and validated for the simultaneous identification and quantification of an important

77 class of compounds, the macrocyclic lactones, which are commonly used as veterinary drugs,  
78 in butter samples. The advantages of this method were ease of extraction, eliminating the use  
79 of SPE, selective derivatization, high sensitivity, a short time period, independence from the  
80 complexity of the fatty matrix, with excellent resolution of the analytes of interest, through a  
81 HPLC-Fluo separation using acetonitrile and water. The study of several parameters including  
82 linearity, recovery, precision, LOD, LOQ,  $CC_{\alpha}$  and  $CC_{\beta}$  allowed the validation of the method.  
83 The good figures of merit obtained showed that the method performed well for the  
84 determination of the analytes. The method was successfully applied to commercial butter  
85 samples acquired in supermarkets in the cities of Niterói and Rio de Janeiro, Brazil. Some  
86 butter samples were free of the ML analyzed, but others showed concentrations of IVM or  
87 DOR below  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  and one sample showed a concentration of DOR of  $11.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ . To  
88 our knowledge, this is the first demonstration of the presence of certain ML (in this case,  
89 ivermectin and doramectin) in butter. The evaluation of a larger number of Brazilian  
90 industrial and artisanal butters is in progress. As far as we are aware, this is the first published  
91 method for the determination of ML in butter. The method also fills a gap in studies of ML in  
92 milk and dairy products.

93

#### 94 **Acknowledgments**

95 The authors are grateful for financial support from the State of Rio de Janeiro Carlos Chagas  
96 Filho Research Foundation (FAPERJ), process E-26/112.620/2012, and from CNPq/MAPA,  
97 process 578782/2008-1. FMC and MFR thank CAPES/Brazil for doctoral fellowships. TFB  
98 thanks UFF for an undergraduate grant. ADPN thanks CNPq for an individual research grant.

99

100

101 **References**

102 Anastasio, A., Esposito, M., Amorena, M., Castellani, P., Serpe, L., & Cortesi, M. L. (2002).  
103 Residue study of ivermectin in plasma, milk, and mozzarella cheese following subcutaneous  
104 administration to buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50,  
105 5241-5245.

106

107 Berendsen, B. J. A., Mulder, P. P. J., & Van Rhijn, H. J. A. (2007). The new derivatisation of  
108 avermectins and milbemycins in milk: new insights and improvement of the procedure.  
109 *Analytica Chimica Acta*, 585, 126-133.

110

111 Brasil. (11 de março de 1996). *Diário Oficial da União. Ministério da Agricultura, Pecuária*  
112 *e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Portaria No 146, de 07 de março de*  
113 *1996. No 48. Seção 1.*

114

115 BS ISO 11843-2. (2005). Capability of detection-part 2: methodology in the linear calibration  
116 case.

117

118 Cerkvenik, V., Doganoc, D. Z., Skubic, V., Beek, W. M. J., & Keukens, H. J. (2001).  
119 Thermal and long-term freezing stability of ivermectin residues in sheep milk. *European*  
120 *Food Research and Technology*, 213, 72–76.

121

122 Cerkvenik, V., Grabnar, I., Skubic, V., Doganoc, D.Z., Beek, W. M. J., Keukens, H. J.,  
123 Drobnic- Kosorok, M., & Pogacnik, M. (2002). Ivermectin pharmacokinetics in lactating  
124 sheep. *Veterinary Parasitology*, 104, 175-185.

125

126 Cerkvenik-Flajs, V., Grabnar, I., Marc, I., Kozuh-Erzen, N., Kuzner, J., & Pogacnik, M.  
127 (2003). Abamectin in sheep's plasma and milk after subcutaneous administration. *Journal of*  
128 *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 26 (1), 283-284.

129

130 Cerkvenik, V., Bogdan Perko, B., Rogelj, I., Doganoc, D., Skubic, V., Beek, W. M. J., &  
131 Keukens, H. J. (2004). Fate of IVM residues in ewes' milk and derived products. *Journal of*  
132 *Dairy Research*, 71, 39–45.

133

134 Cerkvenik-Flajs, V., Grabnar, I., Kozuh-Erzen, N., Marc, I., Pozgan, U., Gombac, M., Kolar,  
135 L., & Pogacnik, M. (2005). Pharmacokinetics of doramectin in lactating dairy sheep and  
136 suckling lambs. *Analytica Chimica Acta*, 529, 353-359.

137

138 Cerkvenik-Flajs, V., Milcinski, L., Süssinger, A., Hodoscek, L., Danaher, M., Antonic, J.  
139 (2010). Trace analysis of endectocides in milk by high performance liquid chromatography  
140 with fluorescence detection, *Analytica Chimica Acta*, 663, 165-171.

141

142 Codex Alimentarius. (1999). Codex standard for butter. Codex Stan A-1-1971. Adopted in  
143 1971. Revision 1999. Amendment 2003, 2006, 2010. Available:  
144 <http://www.codexalimentarius.org>.

145

146 Codex Alimentarius. (2009). Guidelines for the design and implementation of national  
147 regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in  
148 food producing animals. Codex Alimentarius Commission. *GL 71-2009*.

149

150 Codex Alimentarius. (2012). *Maximum residue limits for veterinary drugs in foods. Updated*  
151 *as at the 35<sup>th</sup> session of the Codex Alimentarius Commission*. 1-40. Available at:  
152 [ftp://ftp.fao.org/codex/weblinks/MRL2\\_e\\_2012.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/weblinks/MRL2_e_2012.pdf).

153

154 da Costa, F. M., Pereira Netto, A. D. (2012). Desenvolvimento e aplicação de métodos para a  
155 determinação de ivermectina em medicamentos de uso veterinário, *Química Nova*, 35, 616-  
156 622.

157

158 Danaher, M., Howells, L. C., Crooks, S. R. H., Cerkvénik-Flajs, V., & O'Keefe, M. (2006).  
159 Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological  
160 matrices. *Journal of Chromatography B*, 844, 175–203.

161

162 Danaher, M., Radeck, W., Kolar, L., Keegan, J., & Cerkvénik-Flajs, V. (2012). Recent  
163 developments in the analysis of avermectin and milbemycin residues in food safety and the  
164 environment. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13, 936-951.

165

166 European Commission. (1996). Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996, implementing  
167 Council Directive 96/23/EC on measures to monitor certain substances and residues thereof in  
168 live animals and animal products. *Official Journal of the European Communities*, L125, 10-  
169 32.

170

171 European Commission. (2002). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002  
172 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods  
173 and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, L221, 8–36.

174

175 European Commission. (2010). Council Regulation (EC) No. 37/2010 of 22 December 2009  
176 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue  
177 limits in foodstuffs of animal origin, Official Journal of the European Union, *L15*, 1–72.

178

179 European Medicines Agency (EMA), European Agency for the Evaluation of Medicinal  
180 Products, EMA/MRL/186/97-FINAL. (1997). Doramectin, pigs and sheep, summary report 3.

181

182 European Medicines Agency (EMA), European Agency for the Evaluation of Medicinal  
183 Products, EMA/MRL/692/99-FINAL. (1999). Abamectin, extension to sheep, summary  
184 report 2.

185

186 European Medicines Agency (EMA), European Agency for the Evaluation of Medicinal  
187 Products, EMA/MRL/777/01-FINAL. (2001). Moxidectin, extension to bovine milk,  
188 summary report 3.

189

190 Galarini, R., Saluti, G., Moretti, S., Giusepponi, D., & Dusi, G. (2013). Determination of  
191 macrocyclic lactones in food and feed. *Food Additives & Contaminants A*, *30*, 1068-1079.

192

193 Gayard, V., Alvinerie, M., & Toutain, P. L. (1999). Comparison of pharmacokinetic profiles  
194 of doramectin and ivermectin pour-on formulations in cattle. *Veterinary Parasitology*, *81*, 47-  
195 55.

196

197 Gianetti, L. Giorgi, A., Necci, F., Ferretti, G., Buiarelli, F., & Neri, B. (2011). Validation  
198 study on avermectine residues in foodstuffs, *Analytica Chimica Acta*, *700*, 11-15.

199

- 200 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) Pesquisa de Orçamentos Familiares -  
201 POF 2008-2009: aquisição alimentar domiciliar per capita. Rio de Janeiro, Brazil. (2010).  
202 Available at:  
203 [http://www.ibge.com.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_aquisica](http://www.ibge.com.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/pof20082009_aquisicao.pdf)  
204 [o/pof20082009\\_aquisicao.pdf](http://www.ibge.com.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/pof20082009_aquisicao.pdf). Accessed on November 11, 2014.  
205
- 206 Imperiale, F. A., Mottier, L., Sallovitz, J. M., Lifschitz, A. L., & Lanusse, C. E. (2003).  
207 Disposition of doramectin milk residues in lactating dairy sheep. *Journal of Agricultural and*  
208 *Food Chemistry*, *51*, 3185-3190.  
209
- 210 Imperiale, F., Buseti, M., Suárez, V., & Lanusse, C. E. (2004). Milk excretion of ivermectin  
211 and moxidectin in dairy sheep: assessment of drug residues during cheese elaboration and  
212 ripening period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 6205–6211.  
213
- 214 Imperiale, F. A., Farias, C., Pis, A., Sallovitz, J. M., Lifschitz, A., & Lanusse, C. (2009).  
215 Thermal stability of antiparasitic macrocyclic lactones milk residues during industrial  
216 processing. *Food Additives & Contaminants A*, *26*, 57–62.  
217
- 218 Lagedo, L. S. (2010). Desenvolvimento e implementação de metodologia para determinação  
219 de resíduos de avermectinas em leite por CLAE-FLUO. Dissertação de Mestrado em  
220 Química, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brazil.  
221
- 222 Lobato, V., Rath, S., & Reyes, F. G. (2006). Occurrence of ivermectin in bovine milk from  
223 the Brazilian retail market. *Food Additives & Contaminants*, *23*, 668-673.  
224

- 225 Lopes, R. P., Reyes, R. C., Romero-González, R., Frenich, A. G., & Vidal, J. L. M. (2012).  
226 Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drugs  
227 residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass  
228 spectrometry. *Talanta*, 89, 201-208.  
229
- 230 Marthe, D. B., Bittencourt, L. M., de Queiroz, M. E. L. R., & Neves, A. A. (2010).  
231 Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretróides em manteiga. *Química*  
232 *Nova*, 33, 1389-1393.  
233
- 234 McManaman, J. L., & Neville, M.C. (2003). Drug excretion in breast milk: mechanisms,  
235 models and drug delivery implications for the infant. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55,  
236 629-641.  
237
- 238 Pereira, J. R. (2009). The efficiency of avermectins (abamectin, doramectin and ivermectin) in  
239 the control of *Boophilus microplus*, in artificially infested bovines kept in field conditions.  
240 *Veterinary Parasitology*, 162, 116–119.  
241
- 242 Prichard, R., Ménez, C., & Lespine, A. (2012). Moxidectin and the avermectins: consanguinity  
243 but not identity, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 134–  
244 153.  
245
- 246 Rose, M. D., Farrington, W. H., & Shearer, G. (1998). The effect of cooking on veterinary  
247 drug residues in food: 7. Ivermectin, *Food Additives & Contaminants*, 15, 157–161.  
248
- 249 Rübensam, G., Barreto, F., Hoff, R. B., Kist, T. L., & Pizzolato, T. M. (2011). A liquid–liquid

250 extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of  
251 macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and  
252 fluorescence detection, *Analytica Chimica Acta*, 705, 24–29.

253

254 Shah, V., Midha, K., & Findlay, J. (2000). Bioanalytical method validation - a revisit with a  
255 decade of progress. *Pharmaceutical Research*, 17, 1551–1557.

256

257 Sheridan, R., & Desjardins, L. (2006). Determination of abamectin, doramectin, emamectin,  
258 eprinomectin, ivermectin, and moxidectin in milk by liquid chromatography electrospray  
259 tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 89, 1088-1094.

260

261 Turnipseed, S. B., Roybal, J. E., Andersen, W. C., & Kuck, L. R. (2005). Analysis of  
262 avermectin and moxidectin residues in milk by liquid chromatography–tandem mass  
263 spectrometry using an atmospheric pressure chemical ionization/atmospheric pressure  
264 photoionization source. *Analytica Chimica Acta*, 529, 159-165.

3.2 ARTIGO 2: Short Communication: Macrocyclic lactone residues in butter from Brazilian markets. Publicado no Periódico: Journal of Dairy Science (<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-9130>)

1 INTERPRETIVE SUMMARY

2

3 Title: Occurrence of veterinary drugs in butter samples

4

5 First Author's Last Name: Macedo

6

7 Summary: Abamectin (ABA), Doramectin (DOR), Ivermectin (IVM) and Moxidectin (MOX)  
8 are macrocyclic lactones (ML) used to prevent or treat parasitic diseases of dairy cows. Their  
9 use should conform to good veterinary practices, to avoid contamination of milk and other  
10 dairy products. Samples of butter purchased in Rio de Janeiro City, Brazil, were analyzed by a  
11 new chromatographic method. All Brazilian samples contained residues of IVM at different  
12 levels, and some contained DOR and ABA. However, no Maximum Residue Limit (MRL) is  
13 established for ML in this matrix.

14

15 SHORT COMMUNICATION:

16 MACROCYCLIC LACTONE RESIDUES IN BUTTER (Running head)

17

18 **Short Communication: Macrocyclic lactone residues in butter**

19 **from Brazilian markets**

20

21 **Fabio Macedo,<sup>\*,†</sup> Eliane Teixeira Marsico,<sup>\*</sup> Carlos Adam Conte Júnior,<sup>\*</sup> Leonardo de**  
22 **Almeida Furtado,<sup>†</sup> Taila Figueredo Brasil,<sup>†</sup> and Annibal Duarte Pereira Netto<sup>†1</sup>**

23

24 <sup>\*</sup> Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho, 64,  
25 Santa Rosa 24230-340, Niterói, RJ, Brazil

26

27 <sup>†</sup> Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Outeiro de São João Batista, s/n,  
28 Valonguinho 24020-141, Niterói, RJ, Brazil

29

30 Corresponding author:

31 Annibal Duarte Pereira Netto

32 Laboratório de Química Analítica Fundamental e Aplicada - Departamento de Química  
33 Analítica - Universidade Federal Fluminense - Outeiro de São João Batista, s/n, Valonguinho  
34 24020-141, Niterói, RJ, Brazil

35 PHONE: +55(21)2629-2355

36 FAX: +55(21)2629-2143

37 e-mail address: annibal@vm.uff.br

38

39 **ABSTRACT**

40 Macrocyclic lactones (ML) are commonly used in drug formulations for the treatment of  
41 parasites in cattle. In Brazil, except for drugs (or formulations) with long-term (half-life)  
42 effects, the ML are registered for use in bovines. Indiscriminate use of ML may result in the  
43 presence of residues in milk and dairy products, due to their lipophilic properties and thermal  
44 stability. This study applied a method of liquid chromatography with fluorimetric detection,  
45 recently developed and validated for the determination of residues of abamectin, doramectin,  
46 ivermectin and moxidectin in butter. The method was applied to 38 samples of commercial  
47 butter purchased in the metropolitan area of Rio de Janeiro, RJ, Brazil between June and  
48 September 2013, analyzed in triplicate. Ivermectin was detected in 89.5% of the samples, with  
49 concentrations between 0.3 and 119.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 76.3% of the samples contained doramectin (0.6  
50 to 64.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and 55.2% contained abamectin (0.7 to 4.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Most butter samples (76.3  
51 %) contained residues of more than one ML; however, no residues of moxidectin were  
52 detected. The results showed a high incidence of the presence of avermectins in butter  
53 samples. Butter is not included in the Brazilian National Plan for Control of Residues and  
54 Contaminants in Animal Products. As ML residues concentrate in lipophilic compounds,  
55 butter and other fatty dairy products should be screened for the presence of ML residues.

56

57 **Key words:** macrocyclic lactone, veterinary drug residue, commercial butter, liquid  
58 chromatography

59

60

## Short Communication

61

62

63 The occurrence of macrocyclic lactones (**ML**) in milk has been reported in several  
64 studies (Lobato et al., 2006; Danaher et al., 2012; Furlani et al., 2014). The avermectins  
65 abamectin (**ABA**), doramectin (**DOR**) and ivermectin (**IVM**), and the milbemycin moxidectin  
66 (**MOX**) are widely used as antiparasitic agents, due to their endectocide properties at low  
67 doses (Souza et al., 2007). In Brazil, these compounds are registered for use in dairy cattle  
68 (SINDAN, 2014). Despite their benefits, these chemicals are only slowly eliminated from the  
69 body of cattle (Danaher et al., 2006), and the recommended withdrawal period must be  
70 obeyed. Their indiscriminate use in veterinary medicine may result in the presence of their  
71 residues in milk and milk-derived products (Furlani et al., 2014).

72

73 Dairy products are important sources of nutrients, especially proteins, minerals and  
74 fatty acids, essential for certain groups of consumers including children, women and the  
75 elderly (Souza et al., 2011). Brazil is the main milk producer in South America and the fifth-  
76 largest producer worldwide (FAO, 2014). Small family farms occupying 24% of the rural area  
77 are responsible for 58% of the total milk production in Brazil (de França et al., 2009).

77

78 In Brazil, ML in milk is monitored under 2 different programs. One of them has been  
79 administered since 1986 by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply under the  
80 National Plan for Control of Residues and Contaminants in Animal Products. The other  
81 program, in effect since 2003, is administered by the Brazilian Ministry of Health, under the  
82 National Health Surveillance Agency (Brasil, 1986; 2003). According to the Ministry of  
83 Agriculture, Livestock and Food Supply, 100% of the 640 raw milk samples analyzed in the  
84 last 5 yr were compliant, showing residues below the maximum residue limits (**MRL**) for ML  
85 in milks adopted in Brazil (10 µg/L for ABA, IVM and MOX, and 15 µg/L for DOR; Brasil,  
2010; 2011; 2012; 2013; 2014a, b). According to the National Health Surveillance Agency,

86 none of the 603 samples (powdered milk and UHT fluid milk) analyzed for ML, showed ABA  
87 and IVM residues above their MRL, but 9 samples (1.49%) showed DOR residues above its  
88 MRL. However, residues of DOR below its MRL were found in 91.3% and 100% of  
89 commercial samples of UHT and powdered milk, respectively, in samples from the city of  
90 Rio de Janeiro (Brasil, 2009). Some investigators (Lobato et al., 2006; Kolberg et al., 2009;  
91 Rubensam et al., 2011; Furlani et al., 2014) in chromatographic studies of the presence of ML  
92 residues in Brazilian milk samples, found no samples of raw, pasteurized or UHT milk with  
93 ML residues above the Brazilian MRL (Brasil, 2014b).

94         Conversely, studies of dairy products have shown that ML are stable under the  
95 common processing conditions of heating (Cerkvenik et al., 2001; Imperiale et al., 2009),  
96 lactic acid fermentation (Cerkvenik et al., 2004), and freezing at -20°C (Cerkvenik et al.,  
97 2001). During cheese production, the highest residual concentrations of ML were measured in  
98 curd and were 3.0 to 4.0 fold higher in sheep and buffalo cheeses than in the corresponding  
99 milks (Anastasio et al., 2002; Imperiale et al., 2004). Although these studies demonstrated the  
100 potential presence of ML in dairy products, and a positive correlation with milkfat content  
101 (Cerkvenik et al., 2004), to the best of our knowledge no analytical methods capable of  
102 evaluating ML in butter have been published, except in our recent paper (Macedo et al.,  
103 2015).

104         Butter is a fatty product derived exclusively from milk, with a minimum milkfat  
105 content of 80% (Codex Alimentarius, 2010), which may concentrate lipophilic compounds.  
106 Therefore, butter may potentially concentrate the lipophilic ML and its monitoring is of  
107 interest, especially as it is an inexpensive and widely consumed food. The estimated annual  
108 per capita consumption of butter ranges from 0.103 to 0.410 kg in different regions of Brazil  
109 (IBGE, 2010).

110           The objective of the current was to evaluate the occurrence of 4 ML (ABA, DOR,  
111 IVM and MOX) in butter sold in the metropolitan area of Rio de Janeiro. The samples  
112 consisted of packages containing 200 g of butter from 38 brands and different lots, of  
113 different origins, produced during May and June 2013. These samples were from different  
114 states in important producer regions: the southeast (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo,  
115 and Espírito Santo) and south (Paraná and Santa Catarina). The samples were purchased in  
116 bakeries and supermarkets in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. The samples  
117 were produced in processing plants under the Federal Inspection Service (**SIF**; 25 samples),  
118 under the Rio de Janeiro State Inspection Service (**SIE**; 6 samples), or the Espírito Santo State  
119 Inspection Service (1 sample). The samples were distributed as follows: Minas Gerais (17),  
120 Rio de Janeiro (10), Paraná (3), Espírito Santo (1), São Paulo (1) and Santa Catarina (1). One  
121 sample from Minas Gerais was a homemade product designated for personal consumption,  
122 and 5 samples were imported from Argentina (2), France (2) and Italy (1). The samples were  
123 stored at  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  until analysis.

124           Solid standards of ABA, DOR and MOX were purchased from Fluka (Steinheim, B-  
125 W, Germany) and of IVM from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Standard stock solutions of  
126 the individual ML (200 mg/L) were prepared by dissolving 2 mg of each standard in 10 mL of  
127 acetonitrile (**ACN**). A working standard solution of the selected compounds (2 mg/L) was  
128 prepared by diluting aliquots of each stock solution with ACN. The stock solutions were  
129 stored at  $-20^\circ\text{C}$  in the dark in amber glass flasks and discarded after 1 mo. These solutions  
130 were used to spike blank samples at different levels for calibration purposes. Both ACN and  
131 ethyl acetate (HPLC grade) were purchased from TediaBrazil (Rio de Janeiro, Brazil). The  
132 derivatization reagents triethylamine, trifluoroacetic anhydride, and trifluoroacetic acid were  
133 purchased from Sigma-Aldrich and 1-methylimidazole was purchased from Fluka. Ultrapure

134 water was prepared in a Millipore Milli-Q system (Billerica, MA), following reverse osmosis  
135 (Rios DI-3, Millipore).

136 Samples were extracted and analyzed in independent triplicates using a procedure  
137 previously developed and validated by Macedo et al. (2015). Briefly, aliquots of 0.5 g of  
138 butter were heated to their melting point (50°C), and 10 mL of a solution containing ACN,  
139 ethyl acetate and water (90:4:6, vol/vol/vol) was added at 50°C. The resulting mixture was  
140 vortex-mixed for 30 s and placed for 2 min in a water bath (50°C), mixed again, and  
141 ultrasonically extracted for 10 min. The mixture was cooled to room temperature and  
142 centrifuged at 4.226 X g for 10 min at room temperature. The upper phase was removed and  
143 filtered through polytetrafluoroethylene filters (0.45 µm, Agilent). The resulting solution was  
144 concentrated to < 500 µL in a rotary evaporator at 60°C and finally concentrated to near  
145 dryness (25 µL) under a gentle nitrogen flow.

146 Calibration standards were prepared as independent triplicates using matrix-matched  
147 calibration. Briefly, blank butters were spiked from 0.8 to 70.0 µg/kg and extracted and  
148 derivatized as described for the samples. Two different calibration ranges (a narrow range,  
149 from 0.8 to 6.0 µg/kg, and a wider range, from 6.0 to 70.0 µg/kg) were used, similar to the  
150 procedure of Cerkvenik-Flajs et al. (2010). The curve equations were adjusted by the least-  
151 squares method, using a linear model for the narrow range and a second-order model for the  
152 wider range of calibration, and used to determine the parameters of the calibration lines and  
153 the correlations between chromatographic peak areas and standard concentrations. This  
154 procedure was adopted because preliminary results showed that some samples contained  
155 concentrations of certain ML, especially IVM and DOR, that significantly exceeded the  
156 narrow calibration range. A dilution step was omitted in order not to reduce the method  
157 throughput, because at least 6 determinations would be necessary for some samples because  
158 they were always analyzed in independent triplicates.

159           The detection of ML using fluorescence required a previous reaction to generate a  
160 fluorescent moiety, which was carried out as described by Berendsen et al. (2007). The  
161 concentrated extracts or appropriate aliquots of the standard solutions were derivatized after  
162 addition of 100  $\mu\text{L}$  of a mixture of methylimidazole:ACN (1:1, vol/vol), 50  $\mu\text{L}$  of  
163 triethylamine, 150  $\mu\text{L}$  of a mixture of trifluoroacetic anhydride:ACN (1:2, vol/vol), and 50  $\mu\text{L}$   
164 of trifluoroacetic acid, heated at 70°C for 30 min, cooled to room temperature, and analyzed  
165 using HPLC with fluorescence detection (Macedo et al., 2015). The chromatographic system  
166 consisted of a vacuum degasser, quaternary pump, autosampler, column oven, and  
167 fluorescence detector (Agilent 1100 Series), and was controlled by an Agilent ChemStation.  
168 The ML were separated using a Waters SunFire C8 column (150 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Waters,  
169 Milford, MA) connected to a guard column (12.5 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) with the same  
170 characteristics. A gradient of acetonitrile and water at a flow rate of 1.2 mL min<sup>-1</sup> allowed the  
171 separation of the ML derivatives. The gradient started at 88% acetonitrile with a linear  
172 increase up to 97% acetonitrile in 8 min, and was then held constant for 4.5 min for a total run  
173 time of 12.5 min. An additional 5-min period was necessary to reestablish the initial  
174 chromatographic conditions. The column temperature was 31°C and the injection volume was  
175 20  $\mu\text{L}$ . The excitation and emission wavelengths were 365 and 470 nm respectively. The  
176 solvents were degassed for 20 min in an ultrasonic bath before use.

177           Table 1 summarizes the main analytical figures of merit of the analytical method of  
178 ML determination (Macedo et al. 2015). The method showed satisfactory selectivity and high  
179 sensitivity for the evaluation of ML residues in butters at the levels commonly found in dairy  
180 products, with a precision evaluated by the coefficient of variation according to tolerances  
181 recommended in international guidelines (EC, 2002; Codex Alimentarius, 2009).

182

183

184 **Table 1.** Validation data for determination of macrocyclic lactones in butter by the optimized  
 185 liquid chromatographic method<sup>1</sup>.

Analyte <sup>2</sup>	Mean LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Mean LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Overall $\text{CC}_\alpha$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Overall $\text{CC}_\beta$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Overall precision (CV %)	Overall recovery (%)
ABA	0.04	0.12	0.14	0.17	10.86	80.50
DOR	0.05	0.15	0.22	0.28	10.40	76.20
IVM	0.05	0.16	0.18	0.25	12.06	94.10
MOX	0.03	0.09	0.13	0.17	12.63	72.90

186 <sup>1</sup> LOD = limit of detection; LOQ = limit of quantification;  $\text{CC}_\alpha$  = decision limit;  $\text{CC}_\beta$  =  
 187 detection capability.

188 <sup>2</sup> ABA = abamectin; DOR = doramectin; IVM = ivermectin; MOX = moxidectin.

189

190 The narrow calibration range (from 0.8 to 6.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), which followed a linear model,  
 191 was employed in the determination of the less-concentrated samples. The wide calibration  
 192 range (from 6.0 to 70.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), which led to a second-order model, was used to estimate the  
 193 concentrations of IVM and DOR in the more-contaminated samples.

194 Calibration curves of individual derivatives obtained in the wide range showed  
 195 excellent determination coefficients ( $\geq 0.999$ ), indicating good adherence to the second-order  
 196 models shown in Table 2. To ensure the confidence of this mathematical treatment, 6 extracts  
 197 of highly contaminated samples were diluted to the linear range initially proposed and were  
 198 reanalyzed (Table 3). The concentrations found using both models were in good agreement,  
 199 thus confirming the validity of using the second-order curve.

200

201

202 **Table 2.** Data for the calibration models of the proposed chromatographic method for  
 203 determination of macrocyclic lactones in butter.

Analyte <sup>1</sup>	Concentration range (µg/kg)	Regression equation <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>
ABA	0.8 - 6.0	Peak area = 11.102 C - 3.9416	0.999
	6.0 - 70.0	Peak area = - 0.0104 C <sup>2</sup> + 10.013 C - 0.4957	0.999
	0.8 - 70.0	Peak area = - 0.0111 C <sup>2</sup> + 10.071 C - 1.3512	0.999
DOR	0.8 - 6.0	Peak area = 6.4762 C - 0.0573	0.998
	6.0 - 70.0	Peak area = - 0.0055 C <sup>2</sup> + 6.4351 C - 0.4216	0.999
	0.8 - 70.0	Peak area = - 0.0052 C <sup>2</sup> + 6.4185 C - 0.1974	0.999
IVM	0.8 - 6.0	Peak area = 8.6512 C + 8.6627	0.998
	6.0 - 70.0	Peak area = - 0.0200 C <sup>2</sup> + 10.932 C - 5.6124	0.999
	0.8 - 70.0	Peak area = - 0.0111 C <sup>2</sup> + 10.164 C + 1.563	0.999
MOX	0.8 - 6.0	Peak area = 10.844 C + 9.9097	0.998
	6.0 - 70.0	Peak area = - 0.0217 C <sup>2</sup> + 14.377 C - 12.961	0.999
	0.8 - 70.0	Peak area = - 0.0131 C <sup>2</sup> + 13.633 C - 0.1866	0.999

204 <sup>1</sup> ABA = abamectin; DOR = doramectin; IVM = ivermectin; MOX = moxidectin.

205 <sup>2</sup> C = analyte concentration.

206

207

208 **Table 3.** Agreement between the concentrations of macrocyclic lactones, estimated using the  
 209 linear and second-order polynomial models for butter analyses

Sample	Analyte <sup>1</sup>	Second-order <sup>2</sup> (µg/kg)	Linear <sup>3</sup> (µg/kg)	Dilution factor	Estimated concentration <sup>4</sup> (µg/kg)	Agreement of values <sup>5</sup> (linear/second-order; %)
1	DOR	35.8	3.6	10	36	100.5
2	DOR	64.7	6.5	10	65	100.4
3	IVM	12.2	1.2	10	12	98.3
4	IVM	23.6	2.3	10	23	97.4
5	IVM	26.8	2.6	10	26	97.0
6	IVM	40.9	4.1	10	41	100.2

210 <sup>1</sup> DOR = doramectin; IVM = ivermectin.

211 <sup>2</sup> Analyte concentration estimated using second-order polynomial model.

212 <sup>3</sup> Analyte concentration estimated by linear model, after dilution.

213 <sup>4</sup> Analyte concentration estimated by linear model x dilution factor.

214 <sup>5</sup> Ratio (concentration by linear model/concentration by second-order polynomial model) x  
 215 100.

216

217 Even though MOX shows a high milk-to-plasma ratio and post-treatment persistence  
 218 in plasma (Imperiale et al., 2004), none of the butters contained residues of MOX. However,  
 219 residues of the other 3 ML (ABA, DOR, and IVM) were present in some butters (Table 4).  
 220 The ABA residues were found in 44.7% of the samples; this was the least common ML found  
 221 in the samples, except for MOX (Table 4). The concentrations of ABA ranged from 0.7 to 4.5  
 222 µg/kg, the latter in a butter produced in Minas Gerais; the median concentration was 1.4  
 223 µg/kg). Six of the 10 samples produced in Rio de Janeiro contained ABA (1.4 - 3.7 µg/kg;

224 median = 2.2 µg/kg). The residues of ABA occurred in a narrow range, and were lower than  
 225 the levels found for DOR and IVM.

226

227 **Table 4.** Occurrence and levels of residues of macrocyclic lactones found in butter samples

ML <sup>1</sup>	Macrocyclic lactone concentrations (µg/kg)			Contaminated samples (%)			
	Minimum	Maximum	Total	SIF <sup>2</sup> (n=25)	SIE <sup>3</sup> (n=7)	IMP <sup>4</sup> (n=5)	HM <sup>5</sup> (n=1)
ABA	0.7	4.5	44.7	52.0	57.1	0	0
DOR	0.6	64.7	76.3	84.0	100.0	0	100.0
IVM	0.3	119.4	89.5	100.0	100.0	20.0	100.0
MOX	-	-	0	0	0	0	0
≥ 2 ML	0.6	119.4	76.3	84.0	100.0	0	100.0
≥ 3 ML	0.7	119.4	44.7	52.0	57.1	0	0

228 <sup>1</sup> ABA = abamectin; DOR = doramectin; IVM = ivermectin; MOX = moxidectin; ML =

229 macrocyclic lactones.

230 <sup>2</sup> Samples produced in dairy processing plants monitored by the Brazilian Federal Inspection

231 Service (SIF).

232 <sup>3</sup> Samples produced in plants monitored by State Inspection Services (SIE).

233 <sup>4</sup> IMP: imported samples.

234 <sup>5</sup> HM: homemade sample.

235

236 The DOR was detected in 76.3% of the butters at concentrations ranging from 0.6 to  
 237 64.7 µg/kg, with the homemade sample from Minas Gerais showing the highest concentration  
 238 among the studied samples. Even excluding this sample, 73.6% of the butters tested positive  
 239 for contamination with DOR (0.6 to 35.8 µg/kg). The level of butter contamination with DOR

240 seems to be related not only to its long persistence in milk (Danaher et al., 2006), but also to  
241 the effectiveness of inspection procedures, because the highest levels (2.6 to 35.8 µg/kg;  
242 median = 11.3 µg/kg) were found in butters produced in plants monitored by SIE. Butters  
243 produced in Rio de Janeiro (1.6 - 9.6 µg/kg; median = 6.0 µg/kg) and Minas Gerais (0.6 - 11.2  
244 µg/kg; median = 3.8 µg/kg) in processing plants under SIF showed similar levels of  
245 contamination and lower concentration ranges than those in plants monitored by SIE. These  
246 results could be explained by the official monitoring of the milk supplied by dairy farms to  
247 dairy processing plants monitored by SIF, which is regularly collected under the authority of  
248 the National Plan for Control of Residues and Contaminants in Animal Products (Brasil,  
249 2014b) and analyzed for the presence of residues. Similarly, Spisso et al. (2010) found a  
250 higher proportion of positive samples for tetracyclines (a class of broad-spectrum  
251 antimicrobials) in pasteurized milks from plants monitored by SIE than by SIF.

252 Ivermectin, the ML residue found most frequently in the butters (89.5%), showed a  
253 similar trend. The highest level of contamination (119.4 µg/kg) was found in a sample  
254 produced in a plant monitored by the Rio de Janeiro SIE, whereas the lowest level (0.3 µg/kg)  
255 was found in a butter from Santa Catarina, under SIF inspection. The same trend was not  
256 observed in the imported brands. Except for 1 sample from Argentina that contained IVM at  
257 1.1 µg/kg, the imported samples were free of all 4 ML investigated. However, this small  
258 number of samples is insufficient to determine the overall quality of imported butter, and  
259 consequently, of the butter produced in these countries.

260 All 33 Brazilian butters contained some level of IVM, regardless of their origins and  
261 federal (SIF) or state inspection (SIE). Twenty-nine of them contained DOR and 17 contained  
262 ABA. At least 87.8% of these samples contained more than 2 ML, and 51.5% contained all 3  
263 avermectins.

264           These results confirm that IVM is the most frequently used ML in treating lactating  
265 cows in the regions of Brazil that provided the butter samples. The occurrence of high levels  
266 of IVM in butters may result from its widespread use in Brazil in beef cattle and dairy cows,  
267 because IVM is present in 76 of the 135 veterinary formulations containing at least 1 of the 4  
268 ML registered for use with cattle in Brazil (SINDAN, 2014).

269           Only a few studies have monitored ML in Brazilian milk (Lobato et al., 2006; Kolberg  
270 et al., 2009; Rubensam et al., 2011, Furlani et al., 2014), and all of them found ML residues  
271 below the Brazilian MRL (Brasil, 2014b). These results agree well with the latest results from  
272 the monitoring plans undertaken by the Brazilian authorities (Brasil, 2009, 2010, 2011, 2012,  
273 2013, 2014a), which showed that milks were compliant (residues below the MRL). This  
274 consistent pattern of ML residues in milk suggests that consumers are not exposed to harmful  
275 levels of these residues by consuming milk produced in these regions of the country.

276           All Brazilian butters contained some level of ML. Due to the lipophilic characteristics  
277 of ML and the high fat content of butter ( $\geq 80\%$  wt/wt), these compounds would become  
278 concentrated in butter. Notwithstanding the different results found for milks and butters, our  
279 results showed that the butters evaluated contained at least 1 of the 4 ML analyzed. Extra-  
280 label use of ML in cattle does not seem to be a risk for milk processing (Cerkvenik et al.,  
281 2004), but can affect public health if these drug residues are present in milk and dairy  
282 products. The presence of ML residues in butter also implies that the mandated withdrawal  
283 period before milking may not always be observed, indicating a lack of compliance with good  
284 veterinary practices. Our data add to the knowledge of consumer exposure to ML in dairy  
285 products. The determination of ML residues in butter has proven to be essential to assure food  
286 quality.

287           To the best of our knowledge, ours is the first published survey presenting data on ML  
288 in butters. Thirty-three Brazilian and 5 imported samples were evaluated. Residues of IVM

289 were found in all Brazilian samples, and residues of DOR and ABA were found in 87.8 and  
290 51.5% of the Brazilian samples. Levels of ABA residues were lower than levels of residues of  
291 DOR and IVM. MOX was not found in any sample. All but 1 sample from the imported  
292 brands showed no ML residues. Our results confirm that IVM and DOR are the ML-class  
293 drugs that are most frequently used in dairy cows in Brazil. Considering that no MRL has  
294 been established for ML in butter, it is not possible to assess the percentage of noncompliant  
295 samples; however, the presence of residues in many samples indicates that good veterinary  
296 practices are not always followed. These results emphasize the importance of including butter,  
297 a high-fat dairy product, in official monitoring plans for lipophilic residues such as ML.

298

299

#### ACKNOWLEDGEMENTS

300

301 The authors are grateful for financial support from the State of Rio de Janeiro Carlos  
302 Chagas Filho Research Foundation (FAPERJ) (process E-26/112.620/2012), and the Brazilian  
303 National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Ministry of  
304 Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) (process 578782/2008-1). Fabio Macedo  
305 thanks CAPES for a doctoral fellowship. Leonardo A. Furtado thanks PIBIC/CNPq for an  
306 undergraduate grant. Taila F. Brasil thanks Federal Fluminense University for an  
307 undergraduate grant. Annibal D. Pereira Netto thanks CNPq for an individual research grant.

308

309

## REFERENCES

- 310  
311
- 312 Anastasio, A., M. Esposito, M. Amorena, P. Castellani, L. Serpe, and M. L. Cortesi. 2002.  
313 Residue study of ivermectin in plasma, milk, and mozzarella cheese following  
314 subcutaneous administration to buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Agr. Food Chem.*  
315 50:5241–5245.
- 316 Berendsen, B. J., P. P. Mulder, and H. J. van Rhijn. 2007. The new derivatisation of  
317 avermectins and milbemycins in milk: new insights and improvement of the  
318 procedure. *Anal. Chim. Acta* 585:126–133.
- 319 Brasil, 1986. Ministério da Agricultura. Portaria No. 51, de 06 de Maio de 1986. Dispõe sobre  
320 a instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de  
321 Origem Animal – PNCRB. DOU Seção 1. 2288. Diário Oficial da União, Brasília, DF,  
322 Brazil. Accessed Jun. 12, 2014.  
323 [http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAto](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=POR&numeroAto=00000051&seqAto=000&valorAno=1986&orgao=MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=)  
324 [PDF&tipo=POR&numeroAto=00000051&seqAto=000&valorAno=1986&orgao=MA](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=POR&numeroAto=00000051&seqAto=000&valorAno=1986&orgao=MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=)  
325 [PA&codTipo=&desItem=&desItemFim=](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=POR&numeroAto=00000051&seqAto=000&valorAno=1986&orgao=MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=)
- 326 Brasil. 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC No. 253 de 16 de  
327 Setembro de 2003. Cria o Programa Nacional de Análise de Resíduos de  
328 Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet. DOU Seção  
329 1. 181:90-91. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brazil. Accessed Jul. 1, 2014.  
330 <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=18/09/2003&jornal=1>  
331  [&pagina=90&totalArquivos=256](http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=18/09/2003&jornal=1)
- 332 Brasil. 2009. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Análise de  
333 Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet.  
334 Relatório 2006-2007. Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (5º e

335 6° anos de atividades). Brasília, DF, Brazil. Accessed Jul. 1, 2014.  
336 <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/72efdb0047458ad19441d43fbc4c6735/P>  
337 [AMVET.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/72efdb0047458ad19441d43fbc4c6735/P)

338 Brasil. 2010. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa No.  
339 06, de 16 de março de 2010. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brazil.  
340 Accessed Jul.5,2014. [ttp://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/CRC/IN%2006](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2006) -  
341 2010.pdf.

342 Brasil. 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa No.  
343 06, de 25 de fevereiro de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brazil.  
344 Accessed Jul.5,2014. [ttp://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/CRC/IN%2006](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2006) -  
345 2011.pdf.

346 Brasil. 2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa No.  
347 07, de 04 de abril de 2012. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brazil.  
348 Accessed Jul.5,2014. [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/CRC/IN%2007](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2007) -  
349 2012.pdf.

350 Brasil. 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa No.  
351 07, de 27 de março de 2013. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brazil. Accessed  
352 Jul.5,2014. [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/CRC/IN%2007-2013.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2007-2013.pdf)

353 Brasil. 2014a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA No. 60, de  
354 07 de maio de 2014. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brazil. Accessed Jul. 5,  
355 2014.  
356 [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/CRC/PORTARIA%20n%2060%20-](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/PORTARIA%20n%2060%20-%20PNCRC%202013.pdf)  
357 [%20PNCRC%202013.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/PORTARIA%20n%2060%20-%20PNCRC%202013.pdf)

358

- 359 Brasil. 2014b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa No.  
360 11, de 07 de maio de 2014. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brazil. Accessed  
361 Jul. 5, 2014. [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/CRC/IN%2011%20-](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2011%20-%20PNCRB%202014.pdf)  
362 [%20PNCRB%202014.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2011%20-%20PNCRB%202014.pdf)
- 363 Cerkvenik, V., D. Z. Doganoc, V. Skubic, W. M. J. Beek, and H. J. Keukens. 2001. Thermal  
364 and long-term freezing stability of ivermectin residues in sheep milk. *Eur. Food Res.*  
365 *Technol.* 213:72–76.
- 366 Cerkvenik, V., B. Perko, I. Rogelj, D. Z. Doganoc, V. Skubic, W. M. Beek, and H. J.  
367 Keukens. 2004. Fate of IVM residues in ewes' milk and derived products. *J. Dairy*  
368 *Res.* 71:39–45.
- 369 Cerkvenik-Flajs, V., L. Milčinski, A. Süssinger, L. Hodošček, M. Danaher, and J. AntoniĆ.  
370 2010. Trace analysis of endectocides in milk by high performance liquid  
371 chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 663:165–171.
- 372 Codex Alimentarius. 2009. Guidelines for the design and implementation of national  
373 regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary  
374 drugs in food producing animals. Codex Alimentarius Commission GL 71-2009.  
375 Accessed Jun. 10, 2014. [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/CRC/CAC-](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/CAC-GL%2071-2009.pdf)  
376 [GL%2071-2009.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/CAC-GL%2071-2009.pdf).
- 377 Codex Alimentarius. 2010. Codex standard for butter. Codex Stan A-1-1971. Adopted in  
378 1971. Revision 1999. Last amendment 2010. Accessed Jun. 12, 2014.  
379 [http://www.codexalimentarius.org/download/standards/170/CXS\\_279e.pdf](http://www.codexalimentarius.org/download/standards/170/CXS_279e.pdf)
- 380 Danaher, M., L. C. Howells, S. R. H. Crooks, V. Cerkvenik-Flajs, and M. O'Keeffe. 2006.  
381 Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in  
382 biological matrices. *J. Chromatogr. B* 844:175–203.

- 383 Danaher, M., W. Radeck, L. Kolar, J. Keegan, and V. Cerkvenik-Flajs. 2012. Recent  
384 developments in the analysis of avermectin and milbemycin residues in food safety  
385 and the environment. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13:936–951.
- 386 de França, C. G., M. E. Del Grossi, and V. P. M. de Azevedo Marques. 2009. Censo  
387 agropecuário 2006 e a agricultura familiar no Brasil. Ministério do Desenvolvimento  
388 Agrário, Brasília, DF, Brazil.
- 389 EC (European Commission). 2002. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002  
390 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical  
391 methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Comm.* L221:8–36.
- 392 FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2014. Accessed Jul. 1,  
393 2014. [http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.](http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.Uw8_zfldXQg)  
394 [Uw8\\_zfldXQg.](http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.Uw8_zfldXQg)
- 395 Furlani, R. P. Z., F. F. G. Dias, P. M. Nogueira, F. M. L. Gomes, S. A.V. Tfouni, and M. C.  
396 R. Camargo. 2014. Occurrence of macrocyclic lactones in milk and yogurt from  
397 Brazilian market. *Food Control* 48:43–47.
- 398 IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2010. Pesquisa de Orçamentos  
399 Familiares - POF 2008-2009 aquisição alimentar domiciliar per capita. Rio de Janeiro,  
400 Brazil. Accessed Jun. 12, 2014.  
401 [http://www.ibge.com.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_a](http://www.ibge.com.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/pof20082009_aquisicao.pdf)  
402 [quisicao/pof20082009\\_aquisicao.pdf.](http://www.ibge.com.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/pof20082009_aquisicao.pdf)
- 403 Imperiale, F., M. Buseti, V. Suárez, and C. Lanusse. 2004. Milk excretion of ivermectin and  
404 moxidectin in dairy sheep: assessment of drug residues during cheese elaboration and  
405 ripening period. *J. Agr. Food Chem.* 52:6205–6211.

- 406 Imperiale, F. A., C. Farias, A. Pis, J. M. Sallovitz, A. Lifschitz, and C. Lanusse. 2009.  
407 Thermal stability of antiparasitic macrocyclic lactones milk residues during industrial  
408 processing. *Food Addit. Contam. A* 26:57–62.
- 409 Kolberg, D. I. S., M. A. Presta, C. Wickert, M. B. Adaime, and R. Zanella. 2009. Rapid and  
410 accurate simultaneous determination of abamectin and ivermectin in bovine milk by  
411 high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Braz. Chem.*  
412 *Soc.* 20:1220–1226.
- 413 Lobato, V., S. Rath, and F. G. Reyes. 2006. Occurrence of ivermectin in bovine milk from the  
414 Brazilian retail market. *Food Addit. Contam.* 23:668–673.
- 415 Macedo, F., E. T. Marsico, C. A. Conte-Júnior, M. F. Resende, T. F. Brasil, and A. D. Pereira  
416 Netto. 2015. Development and validation of a method for the determination of low–  
417 ppb levels of macrocyclic lactones in butter, using HPLC–fluorescence. *Food. Chem.*  
418 179:239–245.
- 419 Rübensam, G., F. Barreto, R. B. Hoff, T. L. Kist, and T. M. Pizzolato. 2011. A liquid–liquid  
420 extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis  
421 of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry  
422 and fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 705:24–29.
- 423 SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal). 2014.  
424 Compêndio de Produtos Veterinários. Accessed Jul. 1, 2014.  
425 <http://www.cpv.com.br/cpv/pesquisar.aspx>.
- 426 Souza, S. V. C., J. A. Lima, J. C. Teodoro, and R. G. Junqueira. 2007. Validação  
427 intralaboratorial de método quantitativo para determinação múltipla de resíduos de  
428 avermectinas em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com  
429 detecção de fluorescência. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27:823–836.

- 430 Souza, S. S., A. G. Cruz, E. H. M. Walter, J. A. F. Faria, R. M. S. Celeghini, M. M. C.  
431 Ferreira, D. Granato, and A. de S. Sant'Ana. 2011. Monitoring the authenticity of  
432 Brazilian UHT milk: A chemometric approach. *Food Chem.* 124:692–695.
- 433 Spisso, B. F., M. A. Monteiro, M. U. Pereira, R. G. Ferreira, R. P. Costa, T. A. Cruz, and A.  
434 W. Nóbrega. 2010. Pilot survey of commercial pasteurized milk consumed in the  
435 metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for tetracyclines residues, including the 4-  
436 epimers of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline. *Food Addit. Contam. B*  
437 *3:220–227.*

3.3 ARTIGO 3: Resíduos de lactonas macrocíclicas em leite e derivados: ocorrência, monitoramento e métodos analíticos (Artigo de revisão de literatura). Manuscrito a ser submetido ao Periódico: *Revista do Instituto Adolfo Lutz*

1 **Resíduos de lactonas macrocíclicas em leite e derivados: ocorrência, monitoramento e**  
2 **métodos analíticos**

3

4 Macrocylic lactone residues in milk and dairy products: occurrence, monitoring plans and  
5 analytical methods

6

7 **Autores: Fabio MACEDO<sup>1\*</sup>, Annibal Duarte Pereira NETTO<sup>2</sup> e Eliane Teixeira**  
8 **MÁRSICO<sup>3</sup>**

9

10 \*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio  
11 de Janeiro. Rua Senador Furtado, 121/125, Maracanã 20270-021, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.  
12 E-mail: fabio.costa@ifrj.edu.br

13 <sup>2</sup>Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Outeiro de São João Batista, s/n,  
14 Valonguinho 24020-141, Niterói, RJ, Brazil

15 <sup>3</sup> Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho, 64,  
16 Santa Rosa 24230-340, Niterói, RJ, Brazil.

17

18 Financiadora: CAPES

19

## 20 RESUMO

21

22 O leite é um alimento nobre sob o ponto de vista nutricional, e sua qualidade possui grande  
23 importância, tanto pelo seu consumo direto, como pela elaboração de produtos lácteos. As  
24 lactonas macrocíclicas são os fármacos veterinários de maior utilização no Brasil, por suas  
25 propriedades antiparasitárias, e ainda que proibidas para animais cuja lactação esteja sendo  
26 aproveitada para consumo humano, são comumente empregadas em rebanhos leiteiros. Se as  
27 Boas Práticas Agropecuárias não forem observadas, resíduos dessas substâncias podem ser  
28 excretados pelo leite e estarem presentes, tanto na matéria-prima como em seus derivados.  
29 Esta revisão apresenta aspectos relevantes sobre a natureza e presença desses resíduos mesmo  
30 após os diferentes processamentos tecnológicos, bem como os resultados dos programas  
31 nacionais de monitoramento, limites de referência, e metodologias analíticas utilizadas para  
32 triagem, quantificação e confirmação de lactonas macrocíclicas em matrizes lácteas. São  
33 ainda apresentados os principais protocolos internacionalmente utilizados para validação de  
34 novas metodologias analíticas, com ênfase nas diferentes técnicas de detecção e extração, e os  
35 parâmetros a serem considerados durante esta etapa. Ressalta-se a necessidade do  
36 desenvolvimento de novas ferramentas analíticas, especialmente para produtos lácteos com  
37 elevado teor de gordura, que permitam a ampliação dos monitoramentos oficiais corroborando  
38 dessa maneira com a verificação da inocuidade do leite e seus derivados.

39

40 **Palavras-chave.** produtos lácteos, lactonas macrocíclicas, fármacos de uso veterinário,  
41 resíduos, métodos analíticos.

42

43 **ABSTRACT**

44

45 Milk is an important food from nutritional aspects, and their quality has great importance, for  
46 its direct consumption, as the preparation of dairy products. Macrocyclic lactones (ML) are  
47 veterinary drugs widely used in Brazil, due its antiparasitic properties, and even prohibited in  
48 lactating animals, are commonly used in dairy cows. If good practices are not observed,  
49 residues may occur in the excreted milk and will be present in both raw milk and in dairy  
50 products. This review presents relevant aspects about the chemical nature and presence of ML  
51 residues even under different technological processing, as well as the results of national  
52 monitoring programs, reference limits, and analytical methods used for screening,  
53 quantification and confirmation of ML in dairy matrices. It also presents the main  
54 international protocols used for new analytical methods validation, emphasizing different  
55 techniques for detection and extraction, and the main related parameters. Highlights to  
56 development of new analytical methods for dairy products with high fat content were  
57 considered, to include them in official monitoring plans to assess milk and dairy products'  
58 quality.

59

60 **Keywords.** dairy products, macrocyclic lactones, veterinary drugs, residues, analytical  
61 methods.

62

## 63 INTRODUÇÃO

64

65 Segundo a norma NBR ISO 22000 o termo “segurança de alimentos” descreve aspectos  
66 relacionados somente à inocuidade, ou seja, que os alimentos não se constituam em vias de  
67 exposição a perigos que possam causar danos à saúde, sejam eles agentes biológicos, físicos,  
68 químicos ou condição do alimento (SPISSO et al., 2010).

69 Perigo químico em alimento pode ser definido como uma contaminação inaceitável de  
70 natureza química, associado às características da matéria-prima ou a introdução deste durante  
71 o processamento, com potencial para causar efeito adverso à saúde do consumidor. Dentre os  
72 perigos químicos em alimentos destacam-se: aditivos alimentares, pesticidas, fármacos de uso  
73 veterinário, elementos inorgânicos, poluentes ambientais, alérgenos, toxinas naturais,  
74 produtos de limpeza e desinfecção e migrantes de embalagens (SILVA, 2006).

75 Fármacos de uso veterinário são perigos químicos que podem ocorrer em alimentos  
76 devido à utilização inadequada e sem a prescrição e orientação do Médico Veterinário, com  
77 utilização de doses empíricas, por diferentes vias de administração, extrapoladas para as  
78 diferentes espécies produtoras de alimentos, sem levar em consideração os aspectos  
79 farmacológicos específicos (BRASIL, 1999).

80 Dentre os anti-parasitários, as moléculas da classe das lactonas macrocíclicas (LM) são  
81 as mais utilizadas na terapêutica dos animais de produção, incluindo ruminantes, suínos, aves,  
82 e peixes. Esta classe de medicamentos apresenta atividade anti-helmíntica perante  
83 endoparasitos digestivos e pulmonares, e ainda atuam contra ectoparasitas (DANAHER et al.,  
84 2006).

85 Em ruminantes, LM podem ser detectadas por meses após a administração nos animais  
86 e as formas excretadas pelo leite permanecem inalteradas após os diversos tratamentos  
87 realizados no beneficiamento desta matéria prima (IMPERIALE et al., 2009). A presença

88 destes resíduos químicos nos produtos de origem animal, mesmo que, em baixas  
89 concentrações, são indicativos do não cumprimento das Boas Práticas Agropecuárias,  
90 sugerindo que outros fármacos comumente empregados também possam estar presentes como  
91 resíduos (BRASIL, 1999).

92 Para determinação de LM em alimentos, as técnicas analíticas devem ser capazes de  
93 garantir sensibilidade suficiente para estarem próximas dos valores de limite máximo de  
94 resíduo (LMR) estabelecidos. As técnicas mais empregadas baseiam-se em métodos  
95 cromatográficos, especialmente cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada ao detector  
96 de fluorescência, principalmente pela elevada sensibilidade, custo mais baixo e ausência de  
97 efeitos de matriz (GALARINI et al., 2013; RÜBENSAM et al., 2011).

98 O sub-programa de monitoramento do Plano Nacional de Controle de Resíduos e  
99 Contaminantes (PNCRC) realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
100 (MAPA), tem monitorado regularmente resíduos de diversas classes em diferentes matrizes e  
101 espécies animais, contudo não descrevem métodos analíticos para determinação de resíduos  
102 desses medicamentos em derivados lácteos (BRASIL, 2014a). Tratando-se de produtos de  
103 consumo regular e diário é essencial que sejam conhecidos os níveis de resíduos de fármacos  
104 usados durante a criação dos animais.

105 Objetivou-se agregar estudos relacionados a uso de LM em animais produtores de leite,  
106 identificando características químicas com a presença de resíduos em produtos lácteos,  
107 apresentando dados dos programas de monitoramento e as metodologias analíticas  
108 disponíveis, a fim de agregar evidências sobre o tema com vistas a nortear o desenvolvimento  
109 de novas investigações.

110

## 111 **Produção de leite no Brasil e o uso de insumos**

112 O leite é muito utilizado na alimentação humana como fonte de proteína, gordura,

113 energia e outros constituintes essenciais e, por oferecer uma equilibrada composição de  
114 nutrientes que resulta em elevado valor biológico, é considerado um dos mais completos  
115 alimentos *in natura* (TRONCO, 2008). É ainda matéria-prima empregada na elaboração de  
116 leite em pó, queijos, iogurte, bebidas lácteas, sobremesas e manteiga, produtos cujo consumo  
117 vem aumentando gradativamente como reflexo do aumento de renda pela população (IBGE,  
118 2010).

119 O Brasil possui o segundo maior rebanho leiteiro do mundo, com produção anual  
120 superior a 33 bilhões de litros de leite, sendo o maior produtor da América Latina, responsável  
121 por 39,2% do volume obtido. No ranking mundial, ocupa a quinta posição, com contribuição  
122 apenas inferior à China, Estados Unidos, Índia e Paquistão (FAO, 2014). Dentre as bacias  
123 nacionais de produção, o estado de Minas Gerais, localizado na Região Sudeste, apresenta a  
124 maior área dedicada à pecuária leiteira no país, contribuindo com aproximadamente 30% da  
125 quantidade produzida e liderando a produção nacional (CERQUEIRA et al., 2014).

126 No entanto, ainda que o país apresente significativa produção, sua base é de pequenos  
127 produtores, que ocupando 24% da área rural respondem por 58% da oferta total de leite para  
128 consumo humano (de FRANÇA et al., 2009). As pequenas propriedades de organização  
129 familiar, geralmente com limitada tecnificação, muitas vezes não apresentam as condições  
130 adequadas para garantir o correto manejo de fezes, controle de pragas e o cumprimento das  
131 Boas Práticas Agropecuárias, tanto que o crescente aumento no volume produzido têm sido  
132 principalmente consequência do maior número de vacas ordenhadas, do que ao aumento da  
133 produtividade (litros de leite/vaca/ano) (EMBRAPA, 2010).

134 Os parasitas dos animais estão entre as principais limitações da produção pecuária  
135 (WALL; MORGAN, 2009), especialmente devido ao clima tropical, com significativas  
136 variações de temperatura e períodos de chuva, que influenciam o manejo dos animais e  
137 favorecem o ciclo dos parasitas (PICININ et al., 2013). Nesse contexto, fármacos de uso

138 veterinário são correntemente utilizados nas propriedades para controle das infestações e  
139 doenças dos animais de produção (LOPES et al., 2012).

140 Dados do mercado brasileiro indicam que o faturamento relativo aos produtos para  
141 saúde animal vem aumentando significativamente a cada ano, sendo a maior parte das  
142 preparações farmacêuticas destinadas a ruminantes (56,3%), incluindo-se neste grupo as  
143 formulações a serem empregadas em vacas destinadas à produção de leite. Dentre as  
144 diferentes classes de produtos farmacêuticos, aquelas com atividades antiparasitárias  
145 apresentam a maior participação, com cerca de 25% do total comercializado, superando  
146 inclusive o importante mercado de antimicrobianos, com 16% (SINDAN, 2014).

147

#### 148 **Características químicas e farmacológicas das lactonas macrocíclicas**

149 As LM são os agentes anti-parasitários mais amplamente usados em animais de  
150 produção, devido às suas ações endo- e ectoparasiticidas, atuando contra artrópodes, como  
151 insetos e ácaros, e helmintos, comuns causadores de verminoses digestivas e pulmonares nos  
152 animais de produção, que prejudicam a criação e a exploração zootécnica dos mesmos  
153 (DANAHER et al., 2006). A utilização por via sub-cutânea é a via de eleição, pois apresenta  
154 eficiente biodisponibilidade, superior ao uso tópico ou oral (PRICHARD; MENEZ;  
155 LESPINE, 2012).

156 O amplo emprego em animais e em seres humanos justifica-se tanto pela efetiva ação  
157 contra parasitas quanto pela baixa toxicidade em mamíferos, tendo em vista que nas baixas  
158 doses terapêuticas usualmente empregadas contra os parasitas, pequena quantidade do  
159 fármaco consegue ultrapassar a barreira hemato-encefálica e distribuir-se para o sistema  
160 nervoso central, local onde são encontrados seus receptores (MCKELLAR; BENCHAOUI,  
161 1996).

162 Para alcançar os alvos farmacológicos nos parasitas, os canais de íons cloreto, as LM

163 devem atravessar diferentes tecidos dos animais. Contudo, devido à atividade da P-  
164 glicoproteína nas membranas celulares, que remove uma ampla variedade de espécies  
165 lipofílicas das células, há efluxo desses xenobióticos dos tecidos, minimizando a ocorrência  
166 de eventos tóxicos em animais nas doses empregadas terapêuticamente (LESPINE et al.,  
167 2008). No endotélio capilar, essas proteínas atuam como componente funcional da barreira  
168 hemato-encefálica, removendo as LM do sistema nervoso central, local do organismo  
169 vertebrado onde poderiam desencadear efeitos tóxicos. Ainda assim, certos parasitas  
170 nematóides têm apresentado elevada expressão dessa proteína, o que tem resultando em  
171 resistência farmacológica a certas LM (PRICHARD; ROULET, 2007; ARDELLI;  
172 PRICHARD, 2008).

173 Estruturalmente ocorrem como uma unidade macrocíclica formada por 16 estruturas,  
174 composta pela união de três grupos: o grupo hexahidrobenzofurano, um grupo dissacarídeo e  
175 um anel espiroquetal (MCKELLAR; BENCHAOUI, 1996), sendo moléculas de elevado peso  
176 molecular e de natureza predominantemente lipofílica (LANUSSE; PRICHARD, 1997).

177 As avermectinas são produzidas a partir da fermentação realizada pelo fungo  
178 *Streptomyces avermitilis*, originando naturalmente dois pares homólogos, Avermectinas A<sub>1</sub> e  
179 A<sub>2</sub>, e B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Após purificação, apenas os isômeros da Avermectina B<sub>1</sub> (referenciada como  
180 Abamectina, ABA) permanecem presentes, ocorrendo como os homólogos B<sub>1a</sub> (encontrado  
181 em maior quantidade) e B<sub>1b</sub> (encontrado em menor quantidade), mas apresentando a mesma  
182 atividade. A Ivermectina (IVM), principal representante da classe é um derivado semi-  
183 sintético produzido por saturação da dupla ligação existente na estrutura entre C-22 e C-23,  
184 que assim como a ABA também deve ocorrer como uma mistura que não contenha menos que  
185 80% do homólogo B<sub>1a</sub> e não mais de 20% de B<sub>1b</sub> (DANAHER, 2006). Por mutação genética,  
186 a mesma espécie de fungo pode produzir Doramectina (DOR), que assemelha-se à ABA, mas  
187 apresenta um ciclohexil na posição C-25 (PRICHARD; MENEZ; LESPINE, 2012). A

188 Eprinomectina (EPR), a avermectina de maior hidrofiliçidade, é um mistura semi-sintética  
189 derivada da ABA por substituição da hidroxila em C-4" por um grupo acetoamino (WHO,  
190 1998).

191 A Moxidectina (MOX), uma Milbemicina, produto da fermentação de *Streptomyces*  
192 *hygroscopicus* ou *Streptomyces cyaneogriseus*, é estruturalmente semelhante, compartilha do  
193 mesmo mecanismo de ação, mas não apresenta o dissacarídeo substituindo o anel macrolídeo  
194 verificado nas avermectinas (DANAHER et al., 2012). Ainda que apresentem notória  
195 lipofilia, em função de diferenças nas estruturas e no peso molecular, podem apresentar  
196 diferentes coeficientes de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ) e, conseqüentemente diferentes graus  
197 de solubilidade. A hidrofobicidade das LM influencia a passagem por membranas, sua  
198 concentração em tecidos animais e secreções e, finalmente, a atividade farmacológica, devido  
199 à pela afinidade pelos receptores (PRICHARD; MENEZ; LESPINE, 2012).

200 Caracterizam-se por serem moléculas persistentes no organismo animal, apresentando  
201 prolongados períodos de meia-vida ( $T_{1/2}$ ) (MCKELLAR; BENCHAOUI, 1996; LANUSSE,  
202 1997; KRAFT, 2003). Aspectos farmacocinéticos como absorção e distribuição, incluindo  
203 concentração plasmática máxima ( $C_{máx}$ ) e  $T_{1/2}$ , dependem da via de administração empregada  
204 (oral, subcutânea ou tópica), dos veículos utilizados na formulação, das características físico-  
205 químicas próprias de cada LM, das condições corporais dos animais medicados e da espécie a  
206 que pertencem (DANAHER et al., 2006). Em bovinos, formulações de longa-ação contendo  
207 LMs podem persistir até 150 dias após aplicação (CLEALE et al., 2004).

208 Em geral, acumulam-se no fígado, nos rins, tecidos muscular e adiposo (LIFSCHITZ,  
209 1999; CLEALE, 2004), sendo excretadas, após limitada metabolização (EMA, 1997a; 1997b;  
210 1999; 2001), principalmente através das fezes, mas também pelo leite (DANAHER et al.,  
211 2012), uma importante via de eliminação para fármacos lipofílicos (IMPERIALE et al.,  
212 2004). O fenômeno deve-se ao epitélio da glândula mamária, como outras membranas

213 biológicas, agir com um barreira lipídica, e a alta hidrofobicidade das LM favorece a partição  
214 para o leite (PRICHARD; MÉNEZ; LESPINE, 2012).

215

### 216 **Excreção e persistência das lactonas macrocíclicas em leite**

217 Exceção feita à EPR, que devido ao menor valor de  $K_{ow}$  dentre as LM apresenta baixo  
218 coeficiente de partição leite/plasma, com apenas 0,1% da dose podendo ser excretada pelo  
219 leite, (ALVINERIE, 1999), estudos com ruminantes observaram que as concentrações de  
220 avermectinas em leite são semelhantes às verificadas no plasma, atingindo no leite de  
221 ovelha valores ainda maiores, 2,5 vezes superiores ao encontrado no plasma (IMPERIALE et  
222 al., 2004), o que se deve à elevada concentração de lipídeos no leite dessa espécie,  
223 confirmando a correlação direta entre a hidrofobicidade das LM e a grande concentração em  
224 matriz lipídica.

225 Experimentos em que os animais foram medicados com formulações contendo LM em  
226 doses recomendadas e por vias normalmente utilizadas constataram que resíduos de IVM  
227 podem ser detectados no leite ordenhado mesmo 29 dias após o término do tratamento  
228 (ANASTASIO et al., 2002; CERKVENIK et al., 2002; CERKVENIK et al., 2004), enquanto  
229 resíduos de ABA foram detectados até o vigésimo terceiro dia após a administração do  
230 fármaco (CERKVENIK et al., 2003).

231 Persistência ainda maior foi verificada em estudos com DOR, que foi detectada entre 30  
232 dias (IMPERIALE et al., 2003) e 37 dias (CERKVENIK et al., 2005) após administração do  
233 medicamento. Os autores concluíram que a  $T_{1/2}$  da DOR é 1,6 vezes maior do que o verificado  
234 para ABA e IVM em leite.

235 No entanto, a milbemicina MOX, com lipofilicidade ainda maior do que as  
236 avermectinas, distribui-se amplamente no organismo animal (BOUSQUET-MELOU et al.,  
237 2004), resultando em coeficientes de partição leite/plasma maiores do que os verificados para

238 as avermectinas, variando entre 4,2 e 18,5 (PRICHARD; MÉNEZ; LESPINE, 2012). Maiores  
239 valores foram verificados em leite de ovelha, em função do elevado teor de gordura da matriz  
240 (IMPERIALE et al., 2004).

241 Uma vez presentes no leite, esses resíduos representam perigos químicos persistentes,  
242 pois os diferentes processos tecnológicos empregados durante o processamento do leite não  
243 são capazes de eliminá-los. Imperiale et al. (2009) constataram estabilidade das LM perante  
244 aos procedimentos convencionais de aquecimento em laticínios (65°C por 30 min ou 75°C por  
245 15 s) ou fervura (100°C por 10 s). Condições de congelamento (-20°C) também foram  
246 estudadas, e mesmo após armazenamento por período de um ano, nenhuma das amostras de  
247 leite apresentou evidência de degradação dos resíduos (CERKVENIK et al., 2001).

248 Com relação a seu comportamento em meio ácido, durante as típicas condições de  
249 elaboração de produtos fermentados (valores de pH entre 4,0 e 4,6), nenhuma alteração em  
250 suas moléculas foi verificada, bem como não exerceram qualquer influência sobre o processo  
251 de fermentação (CERKVENIK et al., 2004).

252

## 253 **Resíduos de lactonas macrocíclicas em leite e produtos lácteos: aspectos legais e** 254 **toxicológicos**

255 A contaminação do leite e dos produtos lácteos pode ocorrer pelo uso indiscriminado  
256 de avermectinas e milbemicinas, quando não se respeita o estabelecido pelas boas práticas  
257 agropecuárias (FURLANI et al., 2014). Nesse sentido, o produtor ou médico veterinário  
258 responsável por realizar tratamento farmacológico nos animais do rebanho deve respeitar  
259 recomendações técnicas como a espécie a que o fármaco se destina, indicação de uso, dose,  
260 via de administração e período de carência (ESCRIBANO et al. 2012).

261 De acordo com a legislação, o período de carência ou de retirada pode ser entendido

262 como o intervalo de tempo que deve ser necessariamente respeitado entre a última  
263 administração do fármaco aos animais do rebanho, sob condições normais de uso, e o  
264 aproveitamento do leite obtido para consumo humano (EC, 2004). Procedendo dessa forma é  
265 possível garantir que a matriz alimentícia não contenha resíduos em quantidades que excedam  
266 o limite máximo permitido, mitigando o potencial de risco ao consumidor (CODEX, 2009).

267 A legislação brasileira, internalizando o conceito do Codex Alimentarius, entende por  
268 resíduo de um fármaco de uso veterinário a fração do princípio ativo, seus metabólitos,  
269 produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento obtidos de  
270 animais tratados (BRASIL, 1999). Os animais, bem como os sistemas de produção, podem  
271 estar expostos a uma grande variedade de fármacos de uso veterinário e outras substâncias  
272 químicas (CODEX, 2009), incluindo pesticidas, metais tóxicos (COOPER et al., 2014) e  
273 poluentes orgânicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, reconhecidos por  
274 serem contaminantes ambientais que atingem os alimentos (EC, 2002)

275 Além de não apresentarem qualquer valor nutricional, resíduos podem gerar efeitos  
276 adversos nos consumidores através de diferentes formas, incluindo efeitos toxicológicos  
277 crônicos, efeitos farmacológicos agudos e reações alérgicas (CODEX, 2009). Respeitando-se  
278 os períodos de carência estabelecidos (EC, 2004), pode-se garantir que, se ocorrerem nos  
279 alimentos, estejam abaixo do LMR tolerado, protegendo assim a saúde do consumidor  
280 (ESCRIBANO et al. 2012).

281 Os LMRs são definidos como a concentração máxima de um resíduo ou substância  
282 farmacologicamente ativa que pode ser permitida em um alimento de origem animal (EC,  
283 2009). No entanto, a caracterização do LMR requer o cálculo prévio de outros parâmetros.  
284 Para tal são realizados ensaios farmacológicos, toxicológicos e microbiológicos, que  
285 usualmente permitem a obtenção do NOAEL ("*No-observed adverse effect level*"), maior  
286 concentração da substância estudada onde não se verificam os efeitos adversos monitorados.

287 Aplicando-se então fatores de segurança, que variam de acordo com a espécie testada,  
288 variabilidade intra- e interespecífica, tempo de estudo, dentre outros, pode-se finalmente  
289 calcular a ingestão diária aceitável (IDA) da substância (WOODWARD, 2009). A IDA é a  
290 quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem  
291 oferecer risco apreciável para a saúde humana. Finalmente, para obtenção dos LMRs, é  
292 necessário associar a IDA aos dados de consumo dos alimentos pelas populações - que  
293 fornecem a ingestão diária média de cada alimento-, bem como o comportamento  
294 farmacocinético da substância estudada no organismo da espécie animal produtora do  
295 alimento avaliado (ESCRIBANO et al. 2012).

296 Portanto, diferentes LMRs e períodos de carência são estabelecidos para cada  
297 substância farmacologicamente ativa, de acordo com cada alimento e com a espécie animal  
298 que provem, sendo portanto uma combinação de diversos eventos e fatores (CODEX, 2009).

299 Os produtores devem usar somente fármacos aprovados em animais de produção e  
300 para as espécies a que são efetivamente destinadas, enquanto substâncias não aprovadas não  
301 devem ser utilizadas. Os órgãos reguladores devem estabelecer quais fármacos podem ser  
302 comercializados e como os medicamentos devem ser usados (CODEX, 2009). Nesse sentido,  
303 tendo em vista o grande potencial de excreção de LM em leite, que podem resultar na  
304 ocorrência de resíduos nessa matriz, e ainda por suas características lipofílicas, que facilitam a  
305 absorção de resíduos após ingestão por humanos, legislações de diversos países ou blocos  
306 econômicos, ainda que variadas, têm sido publicadas e atualizadas para evitar não  
307 conformidades (ESCRIBANO et al., 2012).

308 Na Europa e nos Estados Unidos, não há permissão para utilização de ABA, DOR e  
309 IVM em animais que estejam produzindo leite para consumo humano (EC, 2009), permitindo-  
310 se, no entanto, o uso de MOX, tendo estabelecido o LMR de 40 ug kg<sup>-1</sup> para os leites de  
311 origem bovina e ovina na União Européia (EC, 2010) e a tolerância de 40 ug kg<sup>-1</sup> para esse

312 analito em leite bovino nos Estados Unidos. Pela legislação japonesa, não há estabelecido  
313 valores permitidos para qualquer das quatro lactonas macrocíclicas citadas (ESCRIBANO et  
314 al., 2012).

315 Já a agência australiana que regula produtos de uso veterinário e pesticidas (APVMA),  
316 estabelece LMRs para ABA (20 ug kg<sup>-1</sup>), DOR (50 ug kg<sup>-1</sup>) e IVM (50 ug kg<sup>-1</sup>) em leite  
317 bovino. Para a MOX vigora o LMR de 2000 ug kg<sup>-1</sup> avaliando o conteúdo na gordura do leite  
318 (APVMA, 2014). O Codex Alimentarius, por sua vez, recomenda apenas valores de LMR  
319 para DOR (15 ug kg<sup>-1</sup>) e IVM (10 ug kg<sup>-1</sup>) (CODEX, 2012).

320 A EPR é a única LM com valores estabelecidos pelas principais legislações com relação  
321 ao controle de resíduos, devido tratar-se de uma molécula sintética de baixa hidrofobicidade.  
322 Os LMR estabelecidos para EPR são: 20 ug L<sup>-1</sup> (Codex Alimentarius), 20 ug L<sup>-1</sup> (União  
323 Européia), 12 ug L<sup>-1</sup> (Estados Unidos, tolerância), 30 ug L<sup>-1</sup> (Austrália) e 20 ug L<sup>-1</sup> (Japão)  
324 (ESCRIBANO et al., 2012).

325 No Brasil, pela legislação atual, não é permitido o processamento na granja ou o envio  
326 de leite a posto de refrigeração ou estabelecimento industrial adequado, quando oriundo de  
327 animais que estejam sendo submetidos a tratamento com medicamentos de uso veterinário em  
328 geral, passíveis de eliminação pelo leite. Os animais devem então ser afastados da produção,  
329 de forma a assegurar que os resíduos não sejam superiores aos níveis fixados em normas  
330 específicas (BRASIL, 2011a).

331 Quando se tratar de substância registrada para uso na espécie-alvo, mas seu respectivo  
332 LMR não for estabelecido pela legislação vigente, que caberia ao Ministério da Saúde, o  
333 limite de referência para tomada de ação regulatória gerencialmente adotado será igual a 10  
334 µg L<sup>-1</sup>. Sendo assim, de acordo com a legislação nacional, que também se orienta de acordo  
335 com as recomendações do Codex Alimentarius, são estabelecidos limites de referência em  
336 leite para ABA (10 ug L<sup>-1</sup>), DOR (15 ug L<sup>-1</sup>), EPR (20 ug L<sup>-1</sup>), IVM (10 ug L<sup>-1</sup>) e MOX (10

337 ug L<sup>-1</sup>) (BRASIL, 2014b).

338 Contudo, pela Instrução Normativa nº 13, de 29 de maio de 2014, o mesmo órgão  
339 fiscalizador (MAPA) proibiu a fabricação, manipulação, fracionamento, comercialização,  
340 importação e uso de produtos antiparasitários de longa ação (acima de 35 dias) que  
341 contenham como princípios ativos as LM para uso veterinário em todos os animais, até que  
342 promova estudos a respeito do assunto (BRASIL, 2014c). Nessas formulações, há ainda  
343 maior risco de ocorrência de níveis elevados de resíduos no leite, especialmente devido aos  
344 veículos oleosos empregados.

345 O produtor deve atentar que apenas as vacas em período seco, ou seja, aquelas que não  
346 estão em fase de lactação devem ser tratadas com esses fármacos, evitando, ainda assim, a  
347 administração próximo ao período do parto e conseqüente início da lactação. Deve ainda  
348 evitar que animais que receberam tratamento tópico mantenham contato com animais não  
349 tratados que estejam produzindo leite para consumo humano, pois pode haver exposição ao  
350 medicamento através da ingestão da preparação farmacêutica (BOUSQUET-MELOU et al.,  
351 2004). De qualquer forma, seja por emprego accidental ou por desvios quanto ao uso, resíduos  
352 de LM podem ocorrer e por estas circunstâncias esses perigos químicos devem ser levados em  
353 consideração (ESCRIBANO et al. 2012).

354

### 355 **Programas de monitoramento de resíduos de lactonas macrocíclicas em leite e derivados**

356 Programas de monitoramento devem ser implementados a fim de garantir a saúde dos  
357 consumidores (CODEX, 2009). Nesse sentido, para a sua elaboração, são levados em  
358 consideração importantes critérios para escolha dos analitos e matrizes a serem monitorados,  
359 tais como: o potencial da substância em deixar resíduo; o potencial de exposição da população  
360 ao resíduo, referenciado pelos hábitos alimentares e poder aquisitivo; sistemas de criação;  
361 potencial do mal emprego dos fármacos, especialmente quanto ao uso correto de

362 medicamentos veterinários (indicação, dose, via de administração, período de carência); e  
363 disponibilidade de metodologias analíticas adequadas, confiáveis, exequíveis e compatíveis  
364 com os recursos laboratoriais disponíveis (BRASIL, 1999).

365 No Brasil, com o objetivo de proteger os consumidores e garantir as práticas comerciais,  
366 resíduos de LM são oficialmente monitorados em leite pelo MAPA (BRASIL, 2014b) e pela  
367 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2009).

368 O PNCRC realizado pela Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), do MAPA, foi  
369 instituído em 1986 (BRASIL, 1986), alterado em 1999 (BRASIL, 1999), e é atualizado  
370 anualmente a fim de monitorar diversas classes de contaminantes, em diversas matrizes da  
371 produção primária como leite, carnes, pescado, ovos e mel (BRASIL, 2014b). No PNCRC são  
372 comportados os sub-programas de monitoramento, de investigação, exploratório e de controle  
373 de produtos importados (BRASIL, 1999). As matrizes analisadas pelo MAPA são obtidas  
374 diretamente em estabelecimentos relacionados às suas atividades de fiscalização sanitária, não  
375 sendo avaliados produtos que estejam expostos ao consumo.

376 Atualmente, no Brasil, existem 1.437 estabelecimentos que produzem leite e derivados  
377 registrados sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal (SIF) (BRASIL, 2014d) e a partir  
378 desses estabelecimentos são coletadas as amostras a serem oficialmente analisadas, incluindo  
379 resíduos de LM (BRASIL, 2014a).

380 Anualmente são publicados os planejamentos dos sub-programas de monitoramento do  
381 MAPA, incluindo as matrizes a serem analisadas por espécie animal, os analitos dentro de  
382 cada grupo, bem como os limites de referência estabelecidos e o número de amostras a serem  
383 coletadas (BRASIL, 2014b), e os resultados referentes ao monitoramento no ano anterior  
384 (BRASIL, 2014a). Com relação ao monitoramento oficial deste órgão nos últimos 6 anos  
385 (BRASIL, 2010; BRASIL, 2011b; BRASIL, 2012; BRASIL, 2013; BRASIL, 2014a;  
386 BRASIL, 2015), os relatórios indicam que foram analisadas 857 amostras de leite bovino cru

387 com relação a resíduos de LM, e todas apresentaram-se em conformidade com a legislação  
388 para essas substâncias (analitos não detectados ou abaixo do LMR).

389 O Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de  
390 Origem Animal (PAMVet), desenvolvido pela (ANVISA) a partir de discussões promovidas  
391 pela autarquia entre 2000 e 2001 (BRASIL, 2000), fiscaliza resíduos de medicamentos  
392 veterinários (antimicrobianos e antiparasitários) apenas em leite bovino exposto ao  
393 consumidor final, seja fluido ou em pó.

394 Pelo relatório divulgado em Junho/2009, o monitoramento realizado entre os anos de  
395 2006 e 2007, analisou 603 amostras de leite processado (465 de leite integral fluido *ultra high*  
396 *temperature* (UHT) e 138 de leite integral em pó). Para estas matrizes, obtidas em pontos de  
397 comercialização, os LMR usados como referência foram de 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para ABA, 15  $\mu\text{g L}^{-1}$   
398 para DOR e de 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  para IVM, e MOX não foi incluída. Os resultados indicam que o  
399 número de amostras de leite que apresentaram resíduos de avermectinas, classe de  
400 antiparasitários analisada, foi superior ao número de amostras que apresentaram resíduos de  
401 fármacos antimicrobianos (BRASIL, 2009).

402 O número de amostras de leite UHT com resíduos, considerando o somatório de todas  
403 as amostras que apresentaram resíduos quantificáveis ou não foi de 192 amostras, o que  
404 representa 41,29% do total de amostras de leite UHT; para leite em pó foi de 52,17%,  
405 equivalente às 72 amostras. No período de monitoramento anterior, entre os anos de 2004 e  
406 2005, a detecção de resíduos de avermectinas havia sido ainda maior, com 55,35% (leite  
407 UHT) e 63,33% (leite em pó) de amostras apresentando resíduos. O estado de Minas Gerais  
408 apresentou-se com o maior número absoluto de amostras contaminadas e o estado do Rio de  
409 Janeiro como o destaque em termos percentuais. O antiparasitário mais comumente  
410 encontrado foi IVM, seguido de DOR e, finalmente, de ABA (BRASIL, 2009).

411 Com relação à sazonalidade, nos meses com as temperaturas mais baixas, a presença de

412 resíduos foi maior do que nos meses com temperaturas mais altas (novembro à março), que  
413 seriam os meses de maior infestação dos animais pelos parasitos e conseqüentemente de  
414 maior uso de antiparasitários. Contudo, a administração de endectocidas segue a  
415 recomendação de realizar o tratamento farmacológico no período seco do ano, que coincide  
416 com os meses mais frios. Ainda deve-se considerar que muitas vezes a vermifugação é  
417 realizada no mesmo dia da vacinação de Febre Aftosa, cuja primeira etapa é realizada no mês  
418 de maio nos estados de grande produção leiteira cuja vacinação é obrigatória como Goiás,  
419 Minas Gerais, Paraná e São Paulo. Com relação especificamente aos resíduos de ABA, os  
420 maiores níveis residuais também verificados no inverno podem ser explicados pelo fato de  
421 que pode ter sido incluída na dieta dos animais ração com caroço de algodão e polpa cítrica,  
422 matérias primas provenientes de culturas em que é permitido o uso de ABA como pesticida  
423 (BRASIL, 2009).

424 Nenhum outro relatório oficial foi publicado desde 2009, mas de acordo com dados  
425 apresentados por Pacheco-Silva et al. (2014), 711 amostras, incluindo leite UHT, leite em pó  
426 e leite pasteurizado foram analisadas pela ANVISA, para resíduos de LM entre 2009 e 2010.  
427 Novamente, as avermectinas (ABA, DOR e IVM) foram os principais analitos detectados,  
428 com destaque para a maior ocorrência de resíduos de IVM, seguida de DOR, indicando serem  
429 os fármacos mais utilizados nos rebanhos leiteiros no Brasil. Em termos percentuais, 39,6%  
430 das amostras de leite em pó apresentavam-se contaminadas por resíduos dessa classe de  
431 antiparasitários, seguidas das amostras de leite UHT (33%) e, finalmente, de 17% das  
432 amostras de leite pasteurizado.

433

#### 434 **Pesquisas científicas de resíduos de lactonas macrocíclicas em leite**

435 A presença de resíduos em produtos de origem animal é um tema de interesse para a  
436 saúde pública (EC, 2002) e, nesse sentido, estudos de prevalência tem fundamental

437 importância, ao coletar dados adicionais na investigação de resíduos em determinados tipos de  
438 produtos e/ou fármacos veterinários específicos (CODEX, 2009).

439 No Brasil, vários trabalhos reportam a presença de resíduos de medicamentos de uso  
440 veterinário em leite. A grande maioria, enfatizando a análise de antimicrobianos, tem  
441 apresentado principalmente resultados conformes (resíduos abaixo do LMR), enquanto que  
442 poucos pesquisas realizadas com vistas à determinação de resíduos de antiparasitários,  
443 incluindo LM, têm apresentado significativo resultados variáveis (Pacheco-Silva et al., 2014).

444 Estudos de Lobato et al. (2006) empregando cromatografia a líquido acoplada a detector  
445 de fluorescência (CLAE-FLUO) verificaram a ocorrência de IVM em amostras de leite  
446 expostas ao consumo (Tipos A, B e C) e em 30 amostras (17,8%) de 168 analisadas foram  
447 identificados resíduos acima do limite de quantificação ( $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), no entanto, nenhuma  
448 apresentou níveis acima do limite de referência para esta avermectina ( $\text{LMR} = 10 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

449 Kolberg et al. (2009) desenvolvendo e validando metodologia, avaliaram 10 amostras de  
450 leite (cinco amostras de leite cru e cinco amostras de leite pasteurizado obtidas no comércio)  
451 por CLAE-FLUO e verificaram a presença de ABA em uma das amostra ( $4,9 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e de  
452 IVM em outra amostra ( $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ), ambas em leite cru.

453 Rübensam et al. (2011), no Laboratório Nacional Agropecuário do estado do Rio  
454 Grande do Sul (LANAGRO-RS), validou metodologia para determinação de LM por CLAE  
455 (detectores de fluorescência e espectrometria de massas), aplicando a técnica em 20 amostras  
456 comerciais de leite integral e a duas amostras de leite cru obtidas diretamente de produtores.  
457 Apenas uma amostra apresentou resíduos de DOR, em concentração inferior à  $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$ .

458 Cerqueira et al. (2014) empregando kits imunoenzimáticos avaliaram 83 amostras de  
459 leite cru provenientes das bacias leiteiras mais importantes do estado de Minas Gerais com  
460 relação à presença de resíduos de avermectinas e MOX. Cinquenta amostras (60,24%)  
461 apresentaram alguma das avermectinas entre o limite de detecção e o LMR, enquanto cinco

462 amostras (6,02%) apresentaram resíduos acima do LMR, todavia, sem ser possível especificá-  
463 las. Com relação a MOX, 61 amostras (73,49%) apresentaram resíduos, mas nenhuma delas  
464 com ocorrência acima do LMR estabelecido pelo MAPA (CERQUEIRA et al., 2014).

465 Pesquisadores do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) avaliaram por CLAE-  
466 FLUO a presença de LM em 13 marcas de leite UHT e em 8 marcas de leite pasteurizado,  
467 adquiridas em supermercados de Campinas, São Paulo. Apenas uma, dentre as 238 amostras  
468 de leite analisadas apresentou resíduos (nesse caso, MOX), todavia, em baixas concentrações  
469 ( $2,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ), abaixo do LMR ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (FURLANI et al., 2014).

470 Ainda que periodicamente sejam publicadas pesquisas sobre o tema, os trabalhos têm  
471 sido realizados monitorando amostras produzidas e/ou comercializadas nas principais regiões  
472 brasileiras (Sul e Sudeste). Nessas regiões, devido às condições socio-econômicas, que  
473 favorecem o acesso à tecnologia e informação, tende a ocorrer o cumprimento das boas  
474 práticas agropecuárias, que resulta em melhor qualidade do leite com relação à presença de  
475 resíduos de fármacos de uso veterinário, comprovado pelos resultados apresentados.

476

#### 477 **Pesquisas científicas de resíduos de lactonas macrocíclicas em produtos lácteos**

478 À despeito dos estudos e monitoramentos realizados em leite, poucos métodos analíticos  
479 e nenhum monitoramento oficial foi realizado com vistas a análise de derivados lácteos  
480 (DANAHER et al., 2012; ESCRIBANO et al., 2012). Furlani et al. (2014) também  
481 investigaram a presença de resíduos de LM em 104 amostras comerciais de iogurte,  
482 adquiridos em supermercados da cidade de Campinas, São Paulo, sem especificação do teor  
483 de gordura. Nenhuma das 13 diferentes marcas analisadas, apresentou resíduos de LM acima  
484 dos limites de detecção obtidos para os analitos investigados (ABA, DOR, IVM e MOX =  $0,6$   
485  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ; EPR =  $0,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

486 Os autores atribuíram a baixa ocorrência ao fato de que as amostras de leite e iogurte

487 analisadas foram elaboradas em indústrias que recebem leite cru de vários produtores, que ao  
488 serem misturados nos tanques, geram diluição dos possíveis resíduos que possam estar  
489 presentes e devido à adoção de boas práticas veterinárias pelos produtores, em função do  
490 monitoramento realizado pelo MAPA através do PNCRC (FURLANI et al., 2014). Ainda que  
491 tenham concluído que os consumidores não estão expostos a riscos relacionados a resíduos de  
492 LM nessas matrizes, não foram avaliados derivados lácteos com elevado teor de lipídeos.

493 Pesquisas internacionais com derivados lácteos com maior teor de gordura evidenciaram  
494 correlação linear entre as concentrações de lactonas macrocíclicas, teor de gordura do leite e  
495 sólidos totais (CERKVENIK et al., 2004), comprovado por experimentos visando a produção  
496 de queijo que verificaram altas concentrações de LM no coalho (IMPERIALE et al., 2004),  
497 sendo as concentrações de LM em queijos 3 à 4 vezes maiores do que nos leites empregados  
498 para sua elaboração (ANASTASIO et al., 2002; IMPERIALE et al., 2004).

499 Após longo período sem publicações com relação à derivados lácteos, Macedo et al.  
500 (2015a) desenvolveram e validaram metodologia para determinação de LM em amostras de  
501 manteiga, produto derivado exclusivamente do leite com teor de gordura não inferior a 80%  
502 (m/m) (CODEX, 2010). O elevado teor de lipídeos da matriz concentrou as LM e a análise de  
503 amostras comerciais nacionais e importadas, revelou que todas as amostras brasileiras  
504 continham pelo menos resíduos de uma LM. O tipo de fiscalização, se do Serviço de Inspeção  
505 Federal (SIF) ou do Serviço de Inspeção Estadual (SIE), bem como a região de produção  
506 apresentaram influência na ocorrência e no nível dos resíduos. Grande diversidade de  
507 resultados foram verificados, com resíduos de avermectinas ocorrendo entre 0,3 e 119,4  $\mu\text{g}$   
508  $\text{kg}^{-1}$ , contudo, não foi possível inferir sobre a conformidade das amostras, tendo em vista que  
509 não há LMR estabelecido para essa matriz, ainda que apresente potencial para concentração  
510 desses analitos (Macedo et al., 2015b). Os autores ressaltaram a importância da inclusão desta  
511 matriz láctea nos programas oficiais de monitoramento.

512

**513 Metodologias analíticas para determinação de resíduos de lactonas macrocíclicas**

514 Para garantir o custo-benefício de uma análise de contaminantes em níveis traço, são  
515 atualmente recomendados o desenvolvimento de métodos multiresíduos e, quando possível,  
516 multiclassés, maximizando o número de analitos a serem determinados em um único  
517 procedimento analítico. As análises de resíduos de fármacos de uso veterinário em produtos  
518 de origem animal devem empregar técnicas que apresentem alta resolução e sensibilidade,  
519 bem como reduzido tempo de análise cromatográfica (LOPES et al., 2012).

520 Diversas metodologias analíticas têm sido desenvolvidas para detecção de diversas  
521 classes de resíduos de fármacos veterinários em alimentos de origem animal, todavia, por não  
522 serem confirmatórios e pela alta variabilidade dos resultados podem ser usados apenas para  
523 *screening* (DANAHER et al., 2012). Exemplos são as metodologias que empregam kits  
524 imunoenzimáticos e/ou microbiológicos que não apresentam a acurácia requerida para  
525 monitoramento oficial e estudos de prevalência (CERQUEIRA et al., 2014).

526 Pela Diretiva 23/1996 da Comunidade Européia (EC, 1996), as LM estão relacionadas  
527 como substâncias do grupo B, como fármacos veterinários com propriedades anti helmínticas.  
528 De acordo com a Decisão 657/2002 da Comunidade Européia, técnicas analíticas  
529 confirmatórias para as lactonas macrocíclicas, devem prover identificação evidente com  
530 relação à estrutura química desses analitos (EC, 2002). Técnicas cromatográficas podem ser  
531 capazes de identificar seletivamente, quantificar e confirmar os resíduos encontrados em  
532 alimentos (CODEX, 2009).

533 A detecção com sistema de ultravioleta (UV) se mostra robusta e útil para  
534 determinações quantitativas de LM em preparações farmacêuticas (DA COSTA; PEREIRA  
535 NETTO, 2012) e rações para animais (DANAHER et al., 2012), podendo ser realizada análise  
536 direta após os procedimentos de extração, mas não apresenta especificidade e alta

537 sensibilidade.

538 Para as análises de resíduos em alimentos, situações em que usualmente ocorrem em  
539 baixas concentrações (frações de  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), o emprego do CLAE-FLUO garante a seletividade  
540 e a sensibilidade requeridas (DANAHER et al., 2012), sendo preferido ao detector de UV para  
541 essas finalidades analíticas.

542 Contudo, as LM não apresentam fluorescência naturalmente, sendo necessário que os  
543 extratos sejam derivatizados antes da injeção no sistema cromatográfico para produção de  
544 derivados fluorescentes (DANAHER, 2012).

545 Em 2007, Berendsen, Mulder e Van Rhijn publicaram novas condições experimentais  
546 que garantiram velocidade, reprodutibilidade e robustez para derivatização e análise de  
547 avermectinas e milbemicinas em amostras de leite. Anidrido trifluoroacético, N-  
548 metilimidazol, ácido trifluoroacético e trietilamina, com incubação subsequente a  $70^{\circ}\text{C}$  por 30  
549 minutos, produziram derivados estáveis por 80 horas na temperatura do laboratório, com  
550 baixos limites de detecção para os analitos testados ( $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (BERENDSEN; MULDER;  
551 VAN RHIJN, 2007).

552 Há comparações do CLAE-FLUO com relação ao emprego da espectrometria de massas  
553 (EM). Turnipseed et al. (2005) afirmam que a determinação de LM empregando CLAE-  
554 FLUO é superior à detecção empregando EM com relação aos limites de detecção e  
555 quantificação. Rübensam et al. (2011) também verificaram que a análise de resíduos de LM  
556 em amostras de leite empregando CLAE-FLUO apresentou menores valores com relação ao  
557 limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão e capacidade de detecção quando  
558 comparados à detecção empregando EM. A ocorrência de significativos efeitos de matriz,  
559 relacionados à etapa de ionização, também foram relacionados a esta técnica. Os valores de  
560 recuperação foram de 100,2 a 105% empregando CLAE-FLUO e de 101,2 a 141,6% quando  
561 utilizada EM (RÜBENSAM et al., 2011).

562 Pelos altos valores para os coeficientes de variação (até 19,8%) verificados na EM,  
563 sugere-se que esta seria interessante apenas para confirmação dos resíduos, enquanto que a  
564 distinção e quantificação de resíduos de LM poderia ser realizada empregando CLAE-FLUO  
565 (coeficientes de variação entre 2,9 e 8,8%). Outro grupo (GALARINI et al., 2013) apontou  
566 que mesmo que os métodos envolvendo EM sejam amplamente utilizados, não parecem ser  
567 superiores aos que empregam detector de fluorescência, especialmente por sua elevada  
568 sensibilidade, baixo custo e ausência de efeitos de matriz. A mesma conclusão é discutida por  
569 Danaher et al. (2012), ao concordarem que muitos métodos baseados em cromatografia a  
570 líquido de alta eficiência acoplada a EM têm sido desenvolvidos para LM, no entanto,  
571 parecem ser mais confiáveis com respeito à confirmação do que com relação à sensibilidade e  
572 quantificação.

573 Com relação a EM, diversas fontes de ionização são empregadas, como fotoionização à  
574 pressão atmosférica em modo negativo (APPI-) (TURNIPSEED et al., 2005), ionização por  
575 eletrospray em modo positivo (ESI+) (SHERIDAN; DESJARDINS, 2006; HE et al., 2009;  
576 ORTELLI et al., 2009; GARRIDO-FRENICH et al., 2010), ionização por eletrospray em  
577 modo negativo (ESI-) (DURDEN, 2007; DURDEN; WOTSKE, 2009), ionização química à  
578 pressão atmosférica em modo positivo (APCI+) (KROGH et al., 2008) e ionização química à  
579 pressão atmosférica em modo negativo (APCI-). Entretanto o modo mais aplicado é aquele  
580 que utiliza fonte de ionização por eletrospray em modo positivo (ESI+) com análise de massas  
581 por triplo quadrupolo (EM/EM) ou por tempo de voo (TOF) (DANAHER et al., 2012).

582 Mesmo que muitos trabalhos estejam direcionados essencialmente aos sistemas de  
583 detecção e separação (KINSELLA et al. 2009), devido aos muitos avanços verificados nessas  
584 áreas, o preparo das amostras é ainda o maior limitante em qualquer procedimento analítico  
585 para determinação de resíduos de fármacos em alimentos (LOPES et al., 2012).

586 A maioria dos estudos para determinação de LM em leite e derivados lácteos é baseada

587 em extração com acetonitrila (CERKVENIK et al., 2010; RÜBENSAM et al., 2011;  
588 FURLANI et al., 2014) ou misturas de acetonitrila com água (IMPERIALE et al., 2004;  
589 PÉREZ et al., 2006). A acetonitrila é um solvente orgânico de grande interesse nesses casos  
590 pois favorece a precipitação de proteínas, quando presente nas amostras, com baixa extração  
591 de lipídeos (DANAHER et al., 2012).

592 Amostras mais fluidas como leite, soro ou iogurte são geralmente extraídas após  
593 simples agitação, com emprego de mesa agitadora, vórtex, ou banho ultrasônico, enquanto  
594 amostras sólidas requerem que a matriz seja previamente dispersa (CERKVENIK et al.,  
595 2004). Para a purificação dos extratos os trabalhos mais recentes empregaram cartuchos (C<sub>8</sub>  
596 ou C<sub>18</sub>) para extração em fase sólida (EFS) (DURDEN; WOTSKE, 2009; CERKVENIK et  
597 al., 2010), extração líquido-líquido (ELL) (RÜBENSAM et al., 2011; FURLANI et al., 2014;  
598 MACEDO et al., 2015) ou método QuEChERS (do inglês "*quick, easy, cheap, effective,*  
599 *rugged and safe*"), traduzido como rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro (LOPES et  
600 al., 2012).

601 Normalmente, as técnicas empregadas para extração de resíduos de matrizes  
602 alimentícias com elevado teor de gordura são trabalhosas, envolvendo muitas etapas de  
603 purificação, que podem ocasionar a perda dos analitos de interesse, que geralmente já ocorrem  
604 em baixas concentrações (GILBERT-LÓPEZ; GARCÍA-REYES; MOLINA-DÍAZ, 2009).  
605 Contudo, Macedo et al. (2015) obtiveram resultados satisfatórios durante validação de  
606 metodologia para determinação de LM em amostras de manteiga empregando ELL a quente  
607 (50°C), utilizando mistura de solventes extratores composta de acetonitrila, acetato de etila e  
608 água.

609 Estudos investigando piretróides, carrapaticidas com características lipofílicas  
610 amplamente utilizados nas criações animais, obtiveram bons parâmetros determinando  
611 resíduos de cipermetrina e deltametrina em leite e bebidas lácteas (GOULART et al., 2008) e

612 em manteiga (MARTHE et al., 2010) após purificação em baixa temperatura (PBT) associada  
613 à ELL ou dispersão de matriz em fase sólida (DMFS), respectivamente. A técnica consiste no  
614 acondicionamento das amostras, após a respectiva extração, em temperatura igual ou inferior  
615 à -20°C, por 6 à 12 horas, para que se obtenha uma fase orgânica superficial contendo os  
616 solventes orgânicos e os analitos de interesse e, uma fase inferior congelada, contendo  
617 constituintes da matriz e a água. Os solventes orgânicos empregados nesses experimentos  
618 foram acetonitrila e acetato de etila.

619

### 620 **Validação de metodologias para determinação de resíduos em alimentos**

621 Os documentos orientativos de maior relevância com relação à validação de métodos  
622 analíticos para determinação de resíduos de fármacos de uso veterinário em alimentos são os  
623 publicados pela Comunidade Européia (EC, 2002) e pelo Codex Alimentarius (CODEX,  
624 2009). Nestes, são indicados os procedimentos a serem adotados para verificação de  
625 performance dos métodos analíticos desenvolvidos.

626 A publicação do Codex Alimentarius apresenta as diretrizes para delineamento e  
627 implementação de programas nacionais para verificação da conformidade dos alimentos  
628 relacionada ao uso de fármacos veterinários em animais que produzem alimentos para  
629 consumo humano (CODEX, 2009). Países que não fazem parte da União Européia, que não  
630 são obrigados a validar seus métodos de acordo com os padrões europeus, podem utilizar esse  
631 delineamento (DANAHER et al., 2012).

632 Os atributos a serem considerados na avaliação da performance dos métodos analíticos  
633 para determinação de resíduos dependem primeiramente da intenção do método, ou seja, se  
634 foram desenvolvidos para simplesmente detectar os analitos (*screening*), quantificá-los  
635 (métodos quantitativos) ou confirmar sua presença (métodos confirmatórios), seguidos de  
636 requisitos relevantes como exatidão, precisão e sensibilidade (CODEX, 2009).

637 Pelas recomendações do Codex Alimentarius (CODEX, 2009), métodos pretendem  
638 determinar resíduos com ocorrência na faixa de concentração entre 1 e 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , a média  
639 dos experimentos de recuperação (em cada nível testado) devem estar entre 60 e 120%, ou 70  
640 a 120% para níveis residuais entre 10 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . A legislação europeia, mais restritiva,  
641 tolera valores de recuperação entre 70 e 110% (EC, 2002) na faixa de concentração entre 1 e  
642 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 80 e 110% para ensaios acima de 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (EC, 2002).

643 No entanto, independente dos valores de recuperação, é desejável que os resultados  
644 estejam associados à baixa variabilidade, característica associada à precisão do método,  
645 normalmente expressa através de coeficientes de variação (CV) ou desvio padrão relativo  
646 (RSD, do inglês *relative standard deviation*), ambos expressos em porcentagem. Em  
647 procedimentos de validação intralaboratorial ("*in-house validation*"), a precisão deve ser  
648 determinada através de experimentos conduzidos em diferentes dias, com reagentes de lotes  
649 distintos, por diferentes analistas e, se possível, em equipamentos distintos (CODEX, 2009).

650 Para avaliação de precisão, de acordo com o Codex Alimentarius, quando estudada a  
651 faixa de concentração de resíduos entre 1 e 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  são tolerados valores de até 30% e,  
652 para níveis maiores, entre 10 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , de até 20% (CODEX, 2009). A legislação  
653 europeia não estabelece valores de coeficientes de variação para ensaios realizados em níveis  
654 residuais abaixo de 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , apenas recomendando que sejam tão baixos quanto possíveis.  
655 Como referência, para métodos que pretendam trabalhar a partir de 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , o valor  
656 estabelecido legislação deve ser de, no máximo, 23% (EC, 2002).

657 Com relação à faixa analítica de interesse, recomenda-se utilizar no mínimo cinco  
658 pontos, além do branco, cobrindo toda a faixa de interesse, resultando em uma curva que se  
659 possa expressar estatisticamente (CODEX, 2009).

660 Uma vez que os limites de detecção e de quantificação estão diretamente relacionados  
661 com a sensibilidade do método analítico (PACHECO-SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014), a

662 legislação europeia (EC, 2002) os substituiu por novos parâmetros de performance para  
663 interpretar os resultados referentes às não conformidades das amostras testadas, que são  
664 também utilizados pelo PNCRC. Devem ser calculados pelo procedimento indicado pela ISO  
665 11843-2 (BS ISO, 2005). Tratam do domínio das concentrações e são: o limite de decisão  
666 ( $CC\alpha$ ), que é definido como o limite a partir do qual pode ser concluído, com uma  
667 probabilidade de erro  $\alpha$ , que uma amostra é não conforme; e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ),  
668 que representa a menor quantidade da substância que pode ser detectada, identificada e/ou  
669 quantificada em uma amostra com uma probabilidade de erro aceitável ( $\beta$ ) (DOVIDAUSKAS  
670 et al, 2013). Para substâncias com LMR estabelecidos,  $\alpha$  e  $\beta$  são iguais a 5%, enquanto para  
671 substância sem LMR definido, o valor de  $\alpha$  será de 1% e o de  $\beta$  de 5% (EC, 2002).

672

## 673 CONCLUSÃO

674 A presença de perigos químicos em alimentos, bem como o entendimento das  
675 circunstâncias pelas quais resíduos de substâncias químicas ocorrem nessas matrizes é de  
676 fundamental importância para garantir a saúde dos consumidores. Fármacos de uso  
677 veterinário, como as lactonas macrocíclicas, amplamente utilizados na criação dos animais  
678 tem grande potencial para deixar resíduos no leite, ressaltando a relevância do tema, pois é um  
679 alimento de amplo consumo por importantes grupos etários da população brasileira.

680 Se as boas práticas agropecuárias não forem devidamente cumpridas, há maior risco  
681 de resíduos de LM em leite, e mesmo que possam ocorrer em baixos níveis, podem interferir  
682 na saúde pública. Devido à reconhecida estabilidade das LM frente aos diferentes tipos de  
683 processamento e por apresentarem elevada lipofilicidade, análises de derivados lácteos com  
684 elevado teor de gordura apresentam grande potencial para investigação científica, bem como  
685 para inclusão nos programas de monitoramento para esses resíduos.

686 Métodos analíticos de baixa acurácia são úteis apenas para triagem das amostras,  
687 enquanto técnicas cromatográficas acopladas a detectores de fluorescência ou espectrometria  
688 de massas são capazes de garantir seletividade, sensibilidade e precisão necessárias à  
689 quantificação e confirmação inequívoca da presença de resíduos de LM, devendo seguir, para  
690 garantir que sejam internacionalmente reconhecidos e validados, diretrizes internacionalmente  
691 reconhecidas, como apresentados pela União Européia e pelo Codex Alimentarius.

692

### 693 REFERÊNCIAS

694

695 Anastasio A, Esposito M, Amorena M, Castellani P, Serpe L, Cortesi ML. Residue study of  
696 ivermectin in plasma, milk, and mozzarella cheese following subcutaneous administration to  
697 buffalo (*Bubalus bubalis*). J Agr Food Chem. 2002;50(18):5241-5.

698

699 Ardelli BF, Prichard RK. Effects of ivermectin and moxidectin on the transcription of genes  
700 coding for multidrug resistance associated proteins and behaviour in *Caenorhabditis elegans*.  
701 J Nematol. 2008;40:290-8.

702

703 Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority – APVMA. [acesso 2015 jan 22].  
704 Disponível em: [<http://www.comlaw.gov.au/Details/F2014C01360>].

705

706 Berendsen BJA, Mulder PPJ, Van Rhijn HJ. A. The new derivatisation of avermectins and  
707 milbemycins in milk: new insights and improvement of the procedure. Anal Chim Acta.  
708 2007;585:126-33.

709

710 Bousquet-Melou A, Mercadier S, Alvinerie M, Toutain PL. Endectocide exchanges between  
711 grazing cattle after pour-on administration of doramectin, ivermectin and moxidectin. *Int J*  
712 *Parasitol.* 2004;34(11)1299-307.

713

714 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 20  
715 de dezembro de 1999. Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem  
716 Animal – PNCR. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil, 22 de dez de 1999. Seção 1.

717

718 Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria nº 51, de 06 de maio de 1986. Dispõe sobre a  
719 instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem  
720 Animal – PNCRB. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil. DOU Seção 1. 2288.

721

722 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 5/2000 ANVISA.  
723 Institui Grupo de Trabalho sobre Medicamentos Veterinários em Alimentos. Diário Oficial da  
724 União, Brasília, DF, Brasil. 27 de jan de 2000.

725

726 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 253, de 16 de setembro  
727 de 2003. Cria o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em  
728 Alimentos de Origem Animal – PAMVet. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil. DOU  
729 Seção 1. 181:90-91.

730

731 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Análise de Resíduos  
732 de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet. Relatório 2006-  
733 2007. Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (5º e 6º anos de atividades);  
734 2009. Brasília, DF, Brasil.

735

736 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 06, de 16  
737 de março de 2010. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil, 23 de mar de 2010.

738

739 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29  
740 de dezembro de 2011a. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite  
741 tipo A, do leite cru refrigerado, do leite pasteurizado e o Regulamento Técnico da coleta de  
742 leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Diário Oficial da União. Brasília, DF, Brasil, 30  
743 de dez de 2011. Anexo IV.

744

745 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 06, de 25  
746 de fevereiro de 2011b. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil, 28 de fev de 2011.

747

748 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 07, de 04  
749 de abril de 2012. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil, 05 de abr de 2012.

750

751 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 07, de 27  
752 de março de 2013. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil, 03 de abr de 2013.

753

754 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA No. 60, de 07 de  
755 maio de 2014a. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil.

756

757 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 07  
758 de maio de 2014b. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil.

759

- 760 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13, de 29  
761 de Maio 2014c. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil. 30 de mai de 2014. Seção 1.  
762
- 763 Brasil. Fiscalização do leite é constante em todo o país; 2014d. [acesso 2014 Dez 20].  
764 Disponível em: [[http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2014/11/fiscalizacao-](http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2014/11/fiscalizacao-do-leite-e-constante-em-todo-o-pais)  
765 [do-leite-e-constante-em-todo-o-pais](http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2014/11/fiscalizacao-do-leite-e-constante-em-todo-o-pais)].  
766
- 767 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA No. 22, de 07 de  
768 abril de 2015. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil.  
769
- 770 BS ISO 11843-2. Capability of detection-part 2: methodology in the linear calibration case;  
771 2005. [acesso 2014 Set 15]. Disponível em:  
772 [[http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=20186](http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=20186)].  
773
- 774 Cerkvenik V, Bogdan Perko B, Rogelj I, Doganoc D, Skubic V, Beek WMJ, Keukens HJ.  
775 Fate of IVM residues in ewes' milk and derived products. J Dairy Res. 2004;71:39-45.  
776
- 777 Cerkvenik, V, Doganoc DZ, Skubic V, Beek WMJ, Keukens HJ. Thermal and long-term  
778 freezing stability of ivermectin residues in sheep milk. Eur Food Res Technol. 2001;213:72-6.  
779
- 780 Cerkvenik-Flajs V, Grabnar I, Kozuh-Erzen N, Marc I, Pozgan U, Gombac M, Kolar L,  
781 Pogacnik M. Pharmacokinetics of doramectin in lactating dairy sheep and suckling lambs.  
782 Anal Chim Acta. 2005;529:353-59.  
783

- 784 Cerkvenik-Flajs V, Grabnar I, Marc I, Kozuh-Erzen N, Kuzner J, Pogacnik M. Abamectin in  
785 sheep's plasma and milk after subcutaneous administration. *J Vet Pharmacol Ther.*  
786 2003;26(1):283-4.
- 787
- 788 Cerkvenik V, Grabnar I, Skubic V, Doganoc DZ, Beek WMJ, Keukens HJ, Drobic- Kosorok  
789 M, Pogacnik M. Ivermectin pharmacokinetics in lactating sheep. *Vet Parasitol.* 2002;104:175-  
790 85.
- 791
- 792 Cerkvenik-Flajs V, Milcinski L, Süssinger A, Hodosek L, Danaher M, Antonic J. Trace  
793 analysis of endectocides in milk by high performance liquid chromatography with  
794 fluorescence detection. *Anal Chim Acta.* 2010;663:165-71.
- 795
- 796 Cerqueira MMOP, Souza FN, Cunha AF, Picinin LCA, Leite MO, Penna CFAM, Souza MR,  
797 Fonseca LM. Detection of antimicrobial and anthelmintic residues in bulk tank milk from four  
798 different mesoregions of Minas Gerais State - Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec.*  
799 2014;66(2):621-5.
- 800
- 801 Cleale RM, Hart KB, Hutchens DE, Johnson EG, Paul AJ, Smith LL, Tucker C, Yazwinski  
802 TA, Doscher ME, Grubbs ST, Wulster-Radcliffe M, Amodie DM. Effects of subcutaneous  
803 injections of a long acting moxidectin formulation in grazing beef cattle on parasite fecal egg  
804 reduction and animal weight gain. *Vet Parasitol.* 2004;126(3):325-38.
- 805
- 806 Codex Alimentarius. Guidelines for the design and implementation of national regulatory  
807 food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food  
808 producing animals. Codex Alimentarius Commission; 2009. (GL 71-2009).

809

810 Codex Alimentarius. Maximum residue limits for veterinary drugs in foods. Updated as at the  
811 35th session of the Codex Alimentarius Commission. 2012.p.1-40.

812

813 Cooper KM, McMahon C, Fairweather I, Elliott CT. Potential impacts of climate change on  
814 veterinary medicinal residues in livestock produce: An island of Ireland perspective. Trends  
815 Food Sci Tech. 2014; In Press (DOI:10.1016/j.tifs.2014.03.007).

816

817 da Costa FM, Pereira Netto AD. Desenvolvimento e aplicação de métodos para a  
818 determinação de ivermectina em medicamentos de uso veterinário. Quím Nova. 2012;35:616-  
819 22.

820

821 Danaher M, Howells LC, Crooks SRH, Cerkvénik-Flajs V, O’Keeffe M. Review of  
822 methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. J  
823 Chromatogr B. 2006;844(2):175-203.

824

825 Danaher M, Radeck W, Kolar L, Keegan J, Cerkvénik-Flajs V. Recent developments in the  
826 analysis of avermectin and milbemycin residues in food safety and the environment. Curr  
827 Pharm Biotechn. 2012;13(6):936-51.

828

829 de França CG, Del Grossi ME, de Azevedo Marques VPM. Censo agropecuário 2006 e a  
830 agricultura familiar no Brasil. Ministério do Desenvolvimento Agrário, Brasília, DF, Brasil;  
831 2009.

832

- 833 Dovidauskas S, Okada IA, Sakuma AM, Duran MC, Oliveira CC. Emprego de planilhas  
834 eletrônicas, baseadas nas normas ISO e recomendações IUPAC, em curvas analíticas da  
835 análise de água. Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo, 2013;72(1):13-24.  
836
- 837 Durden DA. Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the  
838 antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin,  
839 mox- idectin and selamectin in milk. J. Chromatogr B Biomed Appl. 2007;850(1-2):134-46.  
840
- 841 Durden DA, Wotske J. Quantitation and validation of macrolide endectocides in raw milk by  
842 negative ion electrospray MS/MS. J Aoac In. 2009;92(2):580-96.  
843
- 844 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Produção, Industrialização e  
845 Comercialização (Produção); 2010. [acesso 2014 Nov 25]. Disponível em:  
846 [<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/producao.php>].  
847
- 848 Escribano M, San Andrés MI, de Lucas JJ, González-Canga A. Ivermectin residue depletion  
849 in food producing species and its presence in animal foodstuffs with a view to human safety.  
850 Curr Pharm Biotechn. 2012;13(6):987-98.
- 851 European Commission – EC. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996, implementing  
852 Council Directive 96/23/EC on measures to monitor certain substances and residues there of  
853 in live animals and animal products. Official Journal of the European Communities; 1996.  
854 L125. p.10-32.  
855
- 856 European Commission – EC. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – Occurrence in foods,  
857 dietary exposure and health effects; 2002. (SCF/CS/CNTM/PAH/29 ADD1 Final)

858

859 European Commission – EC. Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the  
860 Council, as amended by Directive 2004/28/EC. Official Journal of the European Union; 2004.  
861 L 311. p.1-66.

862

863 European Commission – EC. EC Regulation No 470/2009 of the European Parliament and of  
864 the Council. Official Journal of the European Union; 2009. L 152. p.11-22.

865

866 European Commission – EC. Council Regulation (EC) n° 37/2010 of 22 December 2009 on  
867 pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue  
868 limits in foodstuffs of animal origin, Official Journal of the European Union; 2010. L15. p.1-  
869 72.

870

871 European Medicines Agency – EMA. Doramectin summary report 1; 1997a.

872

873 European Medicines Agency – EMA. Doramectin, pigs and sheep, summary report 3; 1997b.  
874 (EMEA/MRL/186/97-FINAL)

875

876 European Medicines Agency – EMA. European Agency for the Evaluation of Medicinal  
877 Products. Abamectin, extension to sheep, summary report 2; 1999. (EMA/MRL/692/99-  
878 FINAL).

879

880 European Medicines Agency – EMA. Moxidectin, extension to bovine milk, summary report  
881 3; 2001. (EMEA/MRL/777/01-FINAL).

882

883 Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. Dairy production and  
884 products: Milk production; 2014. [acesso 2015 Jan 09]. Disponível em:  
885 [[http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.Uw8\\_zfldXQg](http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.Uw8_zfldXQg)].

886

887 Furlani RPZ, Dias FFG, Nogueira PM, Gomes FML, Tfouni SAV, Camargo MCR.  
888 Occurrence of macrocyclic lactones in milk and yogurt from Brazilian market. *Food Control*.  
889 2014;48:43-7.

890

891 Galarini R, Saluti G, Moretti S, Giusepponi D, Dusi G. Determination of macrocyclic lactones  
892 in food and feed. *Food Addit Contam A*. 2013;30(6):1068-79.

893

894 Garrido-Frenich A, Aguilera-Luiz MM, Martínez-Vidal JL, Romero-González R. Comparison  
895 of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-  
896 high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*.  
897 2010;661:150-60.

898

899 Gilbert-López B, García-Reyes JF, Molina-Díaz A. Sample treatment and determination of  
900 pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. *Talanta*. 2009;79(2):109-28.

901

902 Goulart SM, Queiroz MELR, Neves AA, Queiroz JH. Low-temperature clean-up method for  
903 the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture  
904 detection. *Talanta*. 2008;75:1320-3.

905

906 He LM, Zhao DH, Su YJ, Liu YH, Nie J, Lian J. Determination of macrocyclic lactone drug  
907 residues in animal muscle by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J AOAC Int.*  
908 2009;92(1):348-58.

909

910 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares -  
911 POF 2008-2009: aquisição alimentar domiciliar per capita. Rio de Janeiro, Brasil; 2010.  
912 [acesso 2015 Jan 10]. Disponível em:  
913 [[http://www.ibge.com.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_aquisica](http://www.ibge.com.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/pof20082009_aquisicao.pdf)  
914 [o/pof20082009\\_aquisicao.pdf](http://www.ibge.com.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/pof20082009_aquisicao.pdf)].

915

916 Imperiale, F, Buseti M, Suárez V, Lanusse C. Milk excretion of ivermectin and moxidectin in  
917 dairy sheep: assessment of drug residues during cheese elaboration and ripening period. *J Agr*  
918 *Food Chem.* 2004;52(20):6205-11.

919

920 Imperiale FA, Farias C, Pis A, Sallovitz JM, Lifschitz A, Lanusse C. Thermal stability of  
921 antiparasitic macrocyclic lactones milk residues during industrial processing. *Food Addit*  
922 *Contam A.* 2009;26(1):57-62.

923

924 Imperiale FA, Mottier L, Sallovitz JM, Lifschitz AL, Lanusse CE. Disposition of doramectin  
925 milk residues in lactating dairy sheep. *J Agr Food Chem.* 2003;51:3185-90.

926

927 Kinsella B, O'mahony J, Malone E, Moloney M, Cantwell H, Furey A, Danaher M. Current  
928 trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *J*  
929 *Chromatogr A.* 2009;1216(46):7977-8015.

930

- 931 Kolberg DIS, Presta MA, Wickert C, Adaime MB, Zanella R. Rapid and accurate  
932 simultaneous determination of abamectin and ivermectin in bovine milk by high performance  
933 liquid chromatography with fluorescence detection. *J Braz Chem Soc.* 2009;20:1220-6.  
934
- 935 Krogh KA, Björklund E, Loeffler D, Fink G, Halling-Sørensen B, Ternes TA. Development  
936 of an analytical method to determine avermectins in water, sediments and soils using liquid  
937 chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2008;1211(1-2):60-9.  
938
- 939 Lespine A, Alvinerie M, Vercruyse J, Prichard RK, Geldhof P. ABC transporter modulation:  
940 a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. *Trends Parasitol.*  
941 2008;24(7):293-8.  
942
- 943 Lifschitz A, Virkel G, Imperiale F, Sutra JF, Galtier P, Lanusse C, Alvinerie M. Moxidectin  
944 in cattle: Correlation between plasma and target tissues disposition. *J Vet Pharmacol Ther.*  
945 1999;22(4):266-73.  
946
- 947 Lobato V, Rath S, Reyes FG. Occurrence of ivermectin in bovine milk from the Brazilian  
948 retail market. *Food Addit Contam.* 2006;23:668-73.  
949
- 950 Lopes RP, Reyes RC, Romero-González R, Frenich AG, Vidal JLM. Development and  
951 validation of a multiclass method for the determination of veterinary drugs residues in chicken  
952 by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta.*  
953 2012;89:201-8.  
954

- 955 Macedo F, Marsico ET, Conte-Júnior, CA, Resende MF, Brasil T F, Pereira Netto AD.  
956 Development and validation of a method for the determination of low-ppb levels of  
957 macrocyclic lactones in butter, using HPLC-fluorescence. *Food Chem.* 2015a;179:239-45.  
958
- 959 Macedo F, Marsico ET, Conte-Júnior, CA, Furtado LA, Brasil T F, Pereira Netto AD. Short  
960 communication: Macrocyclic lactone residues in butter from Brazilian markets. *J Dairy Sci.*  
961 2015b;98:3695-3700.  
962
- 963 Marthe DB, Bittencourt LM, de Queiroz MELR, Neves AA. Desenvolvimento de  
964 metodologia para determinação de piretróides em manteiga. *Quím. Nova.* 2010;33:1389-93.  
965
- 966 Mckellar QA, Benchaoui HA. Avermectins and milbemycins. *J Vet Pharmacol Ther.*  
967 1996;19(5):331-51.  
968
- 969 Ortelli D, Cognard E, Jan P, Edder P. Comprehensive fast multiresidue screening of 150  
970 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight  
971 mass spectrometry. *J Chromatogr B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life*  
972 *Sciences.* 2009;877(23):2363-74.  
973
- 974 Pérez L, Palma C, Villegas R, Vega M, Pérez R. Analytical methodology for the detection of  
975 ivermectin residues in milk samples from dairy farms in the province of Ñuble, Chile. *Arch*  
976 *Med Vet.* 2006;38(2):143:50.  
977
- 978 Pacheco-Silva E, Souza JR, Caldas ED. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e  
979 ovos. *Quím Nova.* 2014;37(1):111-22.

- 980
- 981 Picinin LCA, Cerqueira MMOP, Vargas EA, Lana AMQ, Toaldo IM, Bordignon-Luiz MT.  
982 Influence of climate conditions on aflatoxin M1 contamination in raw milk from Minas  
983 Gerais State, Brazil. *Food Control*. 2013;31(2):419-24.
- 984
- 985 Prichard, R. How do anthelmintic drugs work? *Veterinary Journal*. 1997;154(1):5-7.
- 986
- 987 Prichard R, Ménez C, Lespine A. Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not  
988 identity. *Int J Parasitol: Drugs and Drug Resistance*. 2012;2:134-53.
- 989
- 990 Prichard RK, Roulet A. ABC transporters and beta-tubulin in macrocyclic lactone resistance:  
991 prospects for marker development. *Parasitology*. 2007;134(8):1123-32.
- 992
- 993 Rübensam G, Barreto F, Hoff RB, Kist TL, Pizzolato TM. A liquid-liquid extraction  
994 procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic  
995 lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence  
996 detection. *Anal Chim Acta*. 2011;705(1-2):24-29.
- 997
- 998 Sheridan R, Desjardins L. Determination of abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin,  
999 ivermectin, and moxidectin in milk by liquid chromatography electrospray tandem mass  
1000 specrometry. *J Aoac In*. 2006;89:1088-1094.
- 1001
- 1002 Silva CI. Higiene Alimentar – Código de Boas Práticas. Documento elaborado no  
1003 âmbito do estágio efetuado na Unidade Operativa de Saúde Pública de Braga; 2006. [acesso  
1004 2015 Jan 09]. Disponível em:

- 1005 [http://www.saudepublica.web.pt/TrabClaudia/HigieneAlimentar\_BoasPraticas/HigieneAlime  
1006 ntar\_CodigoBoasPraticas1.htm].  
1007
- 1008 Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal – SINDAN. Compêndio de  
1009 Produtos Veterinários; 2014. [acesso 2015 Jan 10]. Disponível em:  
1010 [http://www.cpvvs.com.br/cpvvs/pesquisar.aspx].  
1011
- 1012 Spisso BF, Monteiro MA, Pereira MU, Ferreira RG, Costa RP, Cruz TA, Nóbrega AW. Pilot  
1013 survey of commercial pasteurized milk consumed in the metropolitan area of Rio de Janeiro,  
1014 Brazil, for tetracyclines residues, including the 4-epimers of oxytetracycline, tetracycline and  
1015 chlortetracycline. *Food Addit Contam B*. 2010;3:220-7.  
1016
- 1017 Tronco VM. Manual para inspeção da qualidade do leite. Santa Maria: Rio Grande do Sul:  
1018 Editora UFSM; 2008.  
1019
- 1020 Turnipseed SB, Roybal JE, Andersen WC, Kuck LR. Analysis of avermectin and moxidectin  
1021 residues in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using an atmospheric  
1022 pressure chemical ionization/atmospheric pressure photoionization source. *Anal Chim Acta*.  
1023 2005;529:159-65.  
1024
- 1025 Wall R, Morgan E. Veterinary parasitology and climate change. *Vet Parasitol*.  
1026 2009;163(4):263.  
1027

- 1028 World Health Organization - WHO. Toxicological evaluation of certain veterinary drug  
1029 residues in food. 1998. [acesso 2015 Mar 25]. Disponível em:  
1030 <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v041je02.htm>  
1031
- 1032 Woodward KN. Maximum residue limits. In: Woodward KN, editor. Veterinary  
1033 Pharmacovigilance. Adverse Reactions to Veterinary Medicinal Products. Wiley-Blackwell,  
1034 Chichester; 2009.p.547-67.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Métodos analíticos capazes de serem empregados na determinação de fármacos de uso veterinário em alimentos são úteis para verificar os níveis de resíduos aos quais os consumidores podem estar diariamente expostos através da alimentação. Este estudo desenvolveu e validou metodologia analítica para determinação de resíduos de lactonas macrocíclicas, anti-parasitários comumente utilizados em animais de produção, em amostras de manteiga. Não havia qualquer estudo prévio sobre resíduos dessa classe de fármacos nesta matriz gordurosa.

Neste trabalho foi otimizada metodologia simples que envolveu fusão da amostra, seguida de extração líquido-líquido empregando mistura de acetoneitrila, acetato de etila e água sob aquecimento, sem a necessidade de etapas adicionais. Os extratos foram pré-concentrados e derivatizados para produção de espécies fluorescentes, capazes de serem determinadas em sistema de cromatografia a líquido acoplado a detector de fluorescência. Os resultados obtidos indicam que o método validado apresentou alta sensibilidade, suficiente para determinação dos resíduos nos níveis que ocorrem em matrizes alimentícias; seletividade, inclusive para utilização como método confirmatório; e valores de recuperação e precisão dentro do estabelecido pelas principais diretrizes internacionais.

A aplicação da metodologia em amostras comerciais de manteiga revelou elevada ocorrência de resíduos de avermectinas, especialmente ivermectina, presente em todas as amostras produzidas no Brasil, em acordo com os resultados dos programas de monitoramento realizados pela ANVISA. No entanto, os resíduos ocorreram em níveis superiores aos verificados em amostras de leite, confirmando a hipótese inicial do estudo de que as lactonas macrocíclicas, por sua natureza lipofílica, poderiam se concentrar em matriz láctea com alto teor de lipídeos.

Pelo apresentado, evidencia-se a significativa exposição da população em função do consumo de produtos cuja produção não segue as Boas Práticas Veterinárias. Assim, de acordo com hábitos culturais das populações relacionados a ingestão estimada dos alimentos, podem resultar diferentes riscos associados ao consumo de manteiga com relação à resíduos de lactonas macrocíclicas, sendo de extrema importância, para caracterização do risco, o estabelecimento de Limites Máximos de Resíduos para esses analitos nessa matriz alimentícia.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVINERIE, M.; SUTRA, J.F.; GALTIER, P. Ivermectin in goat plasma and milk after subcutaneous injection. *Veterinary Research*, v. 24, n. 5, p. 417–421, 1993.

BEYER, A.; BIZIUK, M. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. *Food Chemistry*, v. 108, n. 2, p. 669–680, 2008.

BOGAN, J. A.; MCKELLAR, Q. A. The pharmacodynamics of ivermectin in sheep and cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 11, n. 3, p. 260–268, 1988.

BOTSOGLOU, N. A.; FLETOURIS, D. J. Drug Residues In Foods: Pharmacology, Food Safety and Analysis. New York: Marcel Dekker, 2001, 154p.

BRINKE, M.; HÖSS, S.; FINK, G.; TERNES, T.A.; HEININGER, P.; TRAUNSPURGER, W. Assessing effects of the pharmaceutical ivermectin on meiobenthic communities using freshwater microcosms. *Aquatic Toxicology*, v. 99, n. 2, p. 126–137, 2010.

CELESTINA, T.V.; KOLAR, L.; GOBEC, I.; KUŽNER, J.; FLAJS, V.C.; POGAČNIK, M.; ERŽEN, N.K. Factors influencing dissipation of avermectins in sheep faeces. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, n. 1, p. 18–23, 2010.

CODEX ALIMENTARIUS. Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual Twentieth Edition World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3243e.pdf>>.

CRAVEN, J.; BJORN, H.; HENNESSY, D.R.; FRIIS, C. The effects of body composition on the pharmacokinetics of subcutaneously injected ivermectin and moxidectin in pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 25, n. 3, p. 227–232, 2002.

DANAHER, M.; O'KEEFFE, M.; GLENNON, J.D.; HOWELLS, L. Development and optimisation of an improved derivatisation procedure for the determination of avermectins and milbemycins in bovine liver. *Analyst*, v. 126, n. 5, p. 576–580, 2001.

FAO/WHO. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Procedures Recommending Maximum Residue Limits – Residues of Veterinary Drugs in Food (187-1999) Roma, 2000. Disponível em:

<[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/2000-06-30\\_JECFA\\_Procedures\\_MRLVD.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/2000-06-30_JECFA_Procedures_MRLVD.pdf)>.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. *Química de Alimentos de Fennema*. 4 ed. Porto Alegre: Atrmed, p.689–717, 2010.

HENNESSY, D. R.; ALVINERIE, M. R.; 2002. Pharmacokinetics of the macrocyclic lactones: conventional wisdom and new paradigms. In: Vercruysse, J., Rew, R.S. (Eds.), *Macrocyclic Lactones and Antiparasitic Therapy*. CAB International, New York, p. 97–123.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). *Censo Agropecuário 2006 Agricultura familiar Primeiros resultados*. Censo agropecuário, Rio de Janeiro, p.1–267, 2006.

KIJAK, P. J. Liquid chromatographic determination of ivermectin in bovine milk: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, v. 75, p. 747–750, 1992.

KOLAR, L.; ERŽEN, N. K. Degradation of abamectin and doramectin in sheep faeces under different experimental conditions. *International Journal of Environment and Pollution*, v. 31, n.1-2, p. 22–33, 2007.

NAGATA, T.; MIYAMOTO, F.; HASEGAWA, Y.; ASHIZAWA, E. Simultaneous determination of residual antiparasitic lactones in bovine muscle and liver by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, v. 86, n. 3, p. 490–493, 2003.

ORTEGA, A. C.; BORGES, M. S. Codex Alimentarius: a segurança alimentar sob a ótica da qualidade. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 19, n. 1, p. 71-81, 2012.

PAYNE, L. D.; MAYO, V. R.; MORNEWECK, L. A.; HICKS, M. B.; WEHNER, T. A. HPLC-fluorescence method for the determination of eprinomectin marker residue in edible bovine tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, n. 9, p. 3501–3506, 1997.

POLLMEIER, M.; MAIER, S.; MORIARTY, K.; DEMONTIGNY, P. High-performance liquid chromatographic assay for the determination of a semisynthetic avermectin analog (eprinomectin) in bovine milk at parts per billion levels - method development and validation. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 772, N. 1, p. 99–105, 2002.

SANDERSON, H.; LAIRD, B.; POPE, L.; BRAIN, R.; WILSON, C.; JOHNSON, D.; BRYNING, G.; PEREGRINE, A.S.; BOXALL, A.; SOLOMON, K. Assessment of the environmental fate and effects of ivermectin in aquatic mesocosms. *Aquatic Toxicology*, v. 85, n. 4, p. 229–240, 2007.

SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 4 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006, 545 p.

TISLER, T.; ERZEN, N.K. Abamectin in the aquatic environment. *Ecotoxicology*, v. 15, n. 6, p. 495–502, 2006.

TOLAN, J. W.; ESKOLA, P.; FINK, D. W.; MROZIK, H.; ZIMMERMAN, L. A. Determination of avermectins in plasma at nanogram levels using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 190, n. 2, p. 367–376, 1980.

TOUTAIN, P.L.; CAMPAN, M.; GALTIER, P.; ALVINERIE, M. Kinetic and insecticidal properties of ivermectin residues in the milk of dairy cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 11, n. 3, p. 288–291, 1988.

WHO. World Health Organization. Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment. Geneva, 2003. 38p. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/amr.pdf>>.

WHO. World Health Organization. About the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2013. 4p. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/about/en/index.html>>.