



RAFAELA DE CARVALHO BAPTISTA

**MOXIDECTINA NO SORO DE CORDEIROS: PERFIL
FARMACOCINÉTICO E AVALIAÇÃO DE SEUS RESÍDUOS EM
DIFERENTES MÉTODOS DE CONTROLE PARASITÁRIO**

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

RAFAELA DE CARVALHO BAPTISTA

**MOXIDECTINA NO SORO DE CORDEIROS: PERFIL
FARMACOCINÉTICO E AVALIAÇÃO DE SEUS RESÍDUOS EM
DIFERENTES MÉTODOS DE CONTROLE PARASITÁRIO**

Orientador: Prof Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA RAFAELA DE CARVALHO BAPTISTA E
ORIENTADA PELO PROF. DR. FELIX GUILLERMO REYES REYES

Assinatura do orientador

CAMPINAS

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Baptista, Rafaela de Carvalho

B229m Moxidectina no soro de cordeiros: perfil farmacocinético e avaliação de seus resíduos em diferentes métodos de controle parasitário / Rafaela de Carvalho Baptista. -- Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Felix Guillermo Reyes Reyes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ovino - Criação. 2. Medicamentos veterinários.
3. Moxidectina. 4. Farmacocinética. I. Guillermo Reyes Reyes, Felix . II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Moxidectin in lamb serum: pharmacokinetic study and its residues in different conditions of parasitocidal control

Palavras-chave em Inglês:

Sheep breeding

Veterinary drug

Moxidectin

Pharmacokinetics

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Felix Guillermo Reyes Reyes [Orientador]

Alda Lúcia Gomes Monteiro

Márcia Regina Assalin

Data da defesa: 11-04-2013

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
Orientador

Profa. Dra. Alda Lúcia Gomes Monteiro
Membro Titular
UFPR

Dra. Márcia Regina Assalin
Membro Titular
EMBRAPA

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas
Membro Suplente
UNICAMP

Dra. Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz
Membro Suplente
EMBRAPA

DEDICATÓRIA

A Deus que renova as minhas forças e à minha família como forma de reconhecimento por estarem sempre ao meu lado, apoiando direta ou indiretamente, e contribuindo para a realização deste sonho. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Deus, à minha família e ao meu namorado que são os meus alicerces. Apesar da distância física sei que estarão sempre presentes em minha vida. Agradeço ao Pai por mais esta oportunidade; à minha família e meu namorado pelo aprendizado constante, por prover a motivação para a realização de meus projetos, por me darem forças e não permitirem que eu esmorecesse frente aos obstáculos, por todo o amor, paciência e dedicação fornecida nesta passagem. Obrigada por tudo o que me ensinaram e vem ensinando até hoje.

Ao Prof. Felix Guillermo Reyes Reyes por me aceitar em seu grupo de pesquisa e pela orientação fornecida.

Aos membros da banca pelas horas dedicadas a esta pesquisa, pelos conhecimentos transmitidos e as sugestões e correções realizadas.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de mestrado concedida.

À Fazenda Experimental da Universidade Federal do Paraná pela criação dos animais e concessão das amostras de soro de cordeiro.

À Profa. Dra. Alda Monteiro pela idealização de um grande projeto e parte deste culminar com a minha dissertação de mestrado.

À EMBRAPA Meio Ambiente por disponibilizar a realização deste trabalho no laboratório de resíduos e contaminantes.

Aos amigos do Laboratório de Resíduos e Contaminantes da EMBRAPA Meio Ambiente: Débora, Geane, Márcia Assalin, Maria, Márcia Godoy, Marley, Taciane, Éder, Sônia e Vera, que me receberam de braços abertos e me deram condições para a realização deste trabalho. Em especial à Dra. Márcia Assalin por todo auxílio fornecido, por toda a paciência dispensada, pelos ensinamentos transmitidos e pela força e incentivo dados nos momentos difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Toxicologia de Alimentos da FEA/UNICAMP: Juliana Teles, Maria José, Kátia Damascena, Michelle Del Bianchi, Luciana Branco, Silvia Pilco, Silvia Helena, Renata Estaiano pelo apoio, conselhos e pela amizade.

Aos meus amigos pelo companheirismo, os conselhos e o incentivo nessa caminhada. Agradeço a todas as pessoas que me dedicaram afeto, energia positiva, torceram e contribuíram para que tudo isto desse certo! Agradeço também aos que colocaram obstáculos no meu caminho. Com certeza contribuíram para que eu me tornasse mais forte.

Muito Obrigada

Rafaela de Carvalho Baptista

“Pai nosso, que estás no céu
Santificado seja o Vosso nome
Venha a nós o Vosso Reino
Seja feita a Vossa vontade
Assim na Terra como no Céu
O pão nosso de cada dia nos daí hoje
Perdoai as nossas ofensas
Assim como nós perdoamos a quem nos tem ofendido
E não nos deixei cair em tentação
Mas livrai-nos do mal
Amém.”

Jesus Cristo, Mateus, 6:9-13

ÍNDICE

RESUMO GERAL	xxiii
SUMMARY	xxv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	2
CAPÍTULO I. Considerações sobre o uso de moxidectina na ovinocultura e aspectos analíticos para a determinação de seus resíduos em soro de cordeiro: uma revisão	5
RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
ASPECTOS ECONÔMICOS NA OVINOCULTURA	10
ENDOPARASITOSE GASTROINTESTINAIS EM PEQUENOS RUMINANTES	15
CONTROLE ANTI-HELMÍNTICO VERSUS RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA	18
LACTONAS MACROCÍCLICAS	21
Mecanismo de Ação	23
Moxidectina	24
Natureza química e farmacocinética da moxidectina	25
MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DA MOXIDECTINA	28
Procedimento para a extração do analito da matriz	29
Métodos para a detecção da moxidectina	35
Espectrometria de massas	42
VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

CAPÍTULO II. Moxidectina no soro de cordeiros: perfil farmacocinético e avaliação de seus resíduos em diferentes métodos de controle parasitário	55
RESUMO	57
ABSTRACT	59
INTRODUÇÃO	60
MATERIAIS E MÉTODOS	62
Materiais e equipamentos	62
Padrões analíticos, Solventes e Reagentes	62
Soluções padrões	62
Amostras de soro de cordeiro	63
Equipamentos	63
Ensaio com os cordeiros	64
Estudo farmacocinético (Fase I)	64
Avaliação dos métodos de controle parasitário em animais em pastagens (Fase II)	65
Método analítico	66
Preparo da amostra	66
Condições do sistema LC-ESI-MS/MS	67
Validação do método	68
Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos da moxidectina no soro	70
RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
Condições cromatográficas	71
Preparo da amostra	75
Validação do método analítico	77
Avaliação da disposição da moxidectina no soro de cordeiros	83
Avaliação dos métodos de controle parasitário em animais em pastagens (Fase II)	89
CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
CONCLUSÕES GERAIS	94
ANEXO	96

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I. Considerações sobre o uso de moxidectina na ovinocultura e aspectos analíticos para a determinação de seus resíduos em soro de cordeiro: uma revisão.

Figura 1.	Balança comercial da ovinocultura no mundo.	11
Figura 2.	Produção de ovinos no Brasil.	12
Figura 3.	Consumo <i>per capita</i> nacional de carnes no Brasil.	14
Figura 4.	Ciclo evolutivo dos nematódeos gastrointestinais em ovinos.	16
Figura 5.	Estrutura química comum à família das Lactonas Macroclílicas	21
Figura 6.	Subgrupo das lactonas.	22
Figura 7.	Diferenças estruturais entre avermectinas (I) e milbemicinas (II).	23
Figura 8.	Diferenças estruturais entre nemadectina e moxidectina.	25
Figura 9.	Ilustração da técnica por SPE.	30
Figura 10.	Modelo de ionização por eletronebulização.	43
Figura 11.	Esquema de um equipamento do tipo (a) triplo quadrupolo e (b) quadrupolo.	44

CAPÍTULO II. Moxidectina no soro de cordeiros: perfil farmacocinético e avaliação de seus resíduos em diferentes métodos de controle parasitário

Figura 1.	Fluxograma da marcha analítica.	67
Figura 2.	Cromatogramas da MOX e SEL na fase móvel (a) sem adição de metanol e (b) com adição de metanol.	72
Figura 3.	Mudança no comportamento de ionização da MOX após injeções consecutivas das amostras a um volume de 10 µL, verificado pela comparação das curvas em solução padrão (PD) e extrato fortificado (EF).	73

Figura 4.	Ausência de efeito matriz significativo ao serem comparadas as curvas em solução padrão (PD) e extrato fortificado (EF) na faixa de trabalho estudada.	76
Figura 5.	Cromatogramas das amostras: (a) de soro branco com monitoramento dos fragmentos m/z 528 e 235 da MOX, (b) de soro branco com monitoramento dos fragmentos m/z 108 e 235 da MOX e (c) da matriz fortificada com 5 ng mL ⁻¹ de MOX e 40 ng mL ⁻¹ de SEL, monitorando os fragmentos m/z 108 e 235 da MOX.	78
Figura 6.	Avaliação do efeito matriz pela comparação das curvas em solvente e extrato fortificado.	79
Figura 7.	Curva analítica da matriz fortificada obtida pela divisão da área da MOX/SEL (concentração do padrão interno 40 ng mL ⁻¹).	80
Figura 8.	Curva analítica da moxidectina em solvente, extrato e matriz fortificada.	81
Figura 9.	Gráfico dos resíduos das curvas em solução padrão (PD), extrato (EF) e matriz fortificada (MF).	82
Figura 10.	Perfil da concentração de moxidectina (MOX) no soro de cordeiros versus tempo, após a administração subcutânea de 0,2 mg kg ⁻¹ peso corpóreo (n=7).	85

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I. Considerações sobre o uso de moxidectina na ovinocultura e aspectos analíticos para a determinação de seus resíduos em soro de cordeiro: uma revisão.

Tabela 1.	Informação nutricional de diferentes tipos de carnes de origem animal em cada 100g de carne assada	13
Tabela 2.	Grau de infecção em ovinos conforme a carga parasitária para o <i>Haemonchus contortus</i> .	19
Tabela 3.	Relação do grau FAMACHA com a coloração conjuntiva ocular e com o hematócrito	20
Tabela 4.	Propriedades físico-químicas da moxidectina	28
Tabela 5.	Métodos para o preparo de amostra	33
Tabela 6.	Métodos para a detecção de lactonas macrocíclicas por LC – MS/MS	40
Tabela 7.	Parâmetros analíticos da validação	46

CAPÍTULO II. Moxidectina no soro de cordeiros: perfil farmacocinético e avaliação de seus resíduos em diferentes métodos de controle parasitário

Tabela 1.	Fragmentos de identificação e confirmação dos analitos.	74
Tabela 2.	Valores dos parâmetros de validação do método por LC-ESI-MS/MS para determinação de moxidectina (MOX) em soro de cordeiro.	84
Tabela 3.	Parâmetros farmacocinéticos da moxidectina (MOX) em soro de cordeiro, após administração subcutânea de 0,2 mg kg ⁻¹ peso corpóreo.	86

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Anidro acético
ABM - Abamectina
ACN - Acetonitrila
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC – Área sob a curva
C18 – Octadecil
C8 - Octil
CIP – Controle Integrado de Pagras
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Cmax - Concentração máxima
CV - Coeficiente de Variação
DOR – Doramectina
DP – Desvio Padrão
EC - Comunidade Europeia (European Commission)
EM – Espectrometria de massas
EMA – Enamectina
LAPOC - Laboratório de Produção e Pesquisa em Ovinos e Caprinos
LC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LMDR – Limite Mínimo de Desempenho Requerido
LMR – Limite Máximo de Resíduos
MS - Espectrometria de massas
MS/MS - Espectrometria de massas sequencial
EPR - Eprinomectina
ESI - Ionização por electronebulização (Eletrospray Ionization)
FA – Fase aquosa
FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
(Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FDA - Administração de Drogas e Medicamentos (Food and Drug Administration)
FE - Fase Estacionária

FLD - Detecção por fluorescência
FM - Fase móvel
GABA – Ácido gama aminobutírico
H₂O - Água
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IP – Pontos de indentificação
IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada
IVM – Ivermectina
Ke – Constante de eliminação
Ko/w – Coeficiente de partição
LMs – Lactonas Macrocíclicas
LOD - Limite de detecção
LOQ - Limite de quantificação
MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MeOH – Metanol
MI - 1-metilimidazol
MOX – Moxidectina
MRM - Monitoramento de Reação Múltipla
MgSO₄ - Sulfato de Magnésio
NaCl - Cloreto de sódio
NEM - Nemadectina
OPG - Contagem de Ovos por Grama de Fezes
pc – Peso corporal
Pgp – P-glicoproteína
PI – Pirimidina
PK – Parâmetros Farmacocinéticos
PSA – Amina primária e secundária
Q – Quadrupolo
Q₂ – Célula de colisão
QqQ - Triplo Quadrupolo

QuEChERS - Rápido, Fácil, Econômico, Efetivo, Robusto e Seguro

(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)

R^2 – Coeficiente de correlação linear

SEL - Selamectina

SPE - Extração em fase sólida (Solid Phase Extraction)

SPE-d - Extração Dispersiva em Fase Sólida

$t_{1/2}$ – Tempo de meia vida

TEA – Trietilamina

TFAA - Anidro trifluoroacético

$T_{máx}$ - Tempo da concentração máxima

WHO - World Health Organization

RESUMO GERAL

A ovinocultura vem despertando enorme interesse em todas as regiões do Brasil e sua produção destina-se, principalmente, na criação de cordeiros. Contudo, um dos grandes impasses nos sistemas de produção, especialmente em pastagens, são as parasitoses gastrointestinais. Os problemas associados com os parasitas acarretam danos à saúde dos animais, reduzindo o seu desempenho e os lucros do produtor. Como medida profilática, faz-se uso dos anti-parasitários, medicamentos veterinários com ação contra endo e ectoparasitas. Contudo, a utilização indiscriminada dos fármacos tem favorecido o desenvolvimento de estirpes resistentes responsáveis pela rápida ineficácia do composto. Como medida de controle dos nematoides gastrointestinais nas criações comerciais de ovinos, o fármaco costuma ser administrado baseando-se no resultado de duas formas de exame diagnóstico: contagem de ovos dos parasitas nas fezes e o teste FAMACHA® (exame da coloração da mucosa ocular) ou a aplicação do composto em períodos regulares de 28 dias, independente de exame. Na tentativa de determinar a melhor posologia (dose/frequência) do anti-helmíntico a ser empregado na prática, busca-se o melhor entendimento de suas propriedades farmacocinéticas, ou seja, determinar a quantidade do fármaco disponível no organismo para geração de um efeito terapêutico adequado. A moxidectina (MOX) é uma lactona macrocíclica que tem se destacado nos últimos anos pela sua eficiência anti-helmíntica em baixas doses e pela longa persistência no organismo dos animais. Deste modo, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar um método analítico, empregando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS), avaliar o perfil farmacocinético da MOX no soro de cordeiros, assim como comparar as concentrações dos resíduos presentes no soro de animais submetidos a diferentes métodos de controle parasitários em condições de criação comercial em pastagens. O método analítico desenvolvido foi validado apresentando exatidão entre 80-107,3 % e valores de precisão entre 1,7-6,7 %. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) determinados foram de 2,0 ng mL⁻¹ e 5,0 ng mL⁻¹, respectivamente. Os resultados dos parâmetros de validação demonstraram que o método foi adequado para determinar a presença da MOX no soro de cordeiro. A disposição da MOX no soro foi

avaliada em cordeiros da raça suffolk (n=7), após administração subcutânea de 0,2 mg kg⁻¹ de peso corpóreo, em uma única dose. As concentrações de MOX no soro apresentaram valores de C_{máx} 8,5 ± 2,81 ng mL⁻¹, e T_{máx} de 1 ± 0,7 dias. Os valores da AUC_{0-∞} e T_{1/2} foram 82,42 ± 8,02 ng dia.mL⁻¹ e 7,66 ± 1,62 dias, respectivamente. Os resultados indicam uma absorção subcutânea lenta e, portanto, maior tempo de exposição sistêmica e menor disponibilidade do fármaco na circulação sanguínea, quando comparado com outras espécies como caprinos, bovinos ou com a ivermectina. Nenhum dos diferentes métodos de controle parasitários avaliados apresentou resíduos de MOX no soro superiores ao limite de quantificação do método.

SUMMARY

The sheep breeding has aroused great deal of interest in all regions of Brazil and its production is mainly intended to the creation of lambs. However, the gastrointestinal parasitosis is one of the major difficulties in the production systems, especially in the field. Parasites cause animals' health damage, reducing their performance and the profits of the producer. As a consequence parasiticides are used as prophylactic measure. However, care on their use must be taken, since the indiscriminate use of veterinary drugs has favored the development of resistant strains, responsible for the loss of the drug effectiveness. As a control of gastrointestinal nematodes in the commercial sheep breeding, the veterinary drug is usually administered based on the result of two forms of diagnostic test: faecal egg count of parasites and the FAMACHA® test (examination of ocular mucosa color), or on the application of the veterinary drug at regular periods of 28 days, independently of any diagnostic test. In an attempt to determine the optimal dosage (dose / frequency) of the parasiticide to be used in practice, it is necessary the better understanding of their pharmacokinetic properties, in order to determine the amount of drug available in the body to generate an adequate therapeutic effect. Moxidectin (MOX) is a macrocyclic lactone that acts against endo and ecto-parasites, and has come to prominence in recent years due to its effectiveness at low doses and long persistence in the organism of the animals. Thus, the present study aimed to develop and validate an analytical method employing liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS), evaluate the pharmacokinetic profile of MOX in the serum of lambs, and to compare the MOX residue levels on the serum of animals subjected to different parasiticial method of control in conditions of commercial breeding in the field. The validated analytical method presented between 80 to 107.3 % accuracy, and precision values between 1.7 - 6.7 %. The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were 2.0 ng mL^{-1} and 5.0 ng mL^{-1} , respectively. The results of the validation parameters showed that the method was suitable to determine the presence of MOX in the lamb serum. The pharmacokinetic profile of MOX was evaluated in suffolk race lambs ($n = 7$), after a single subcutaneous dose administration of 0.2 mg kg^{-1} body weight. The serum concentrations of MOX showed C_{max} value of $8.5 \pm$

2.81 ng mL⁻¹, and Tmax of 1 day. The AUC_{0-∞} and the T_{1/2} were 82.42 ± 8.02 ng day.mL⁻¹ and 7.66 ± 1.62 days, respectively. The results indicated a slow MOX subcutaneous absorption and, therefore, increased systemic exposure time and low availability of the drug in blood circulation, when compared to other species such as goats or cattle, or to ivermectin. None of the different parasitocidal control methods evaluated showed MOX residue levels above the LOQ of the analytical method.

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a ovinocultura é uma atividade em grande desenvolvimento, justificado por investimentos crescentes e nas estratégias de conquistas de comercialização, sendo encontrados, frequentemente, sistemas de criação caracterizados por pastagens com altas lotações e, conseqüentemente, com grande contaminação de larvas (Viana, 2008).

Como medida profilática, faz-se uso dos anti-helmínticos, medicamentos veterinários com ação contra endo e ectoparasitas, buscando garantir a produção e evitando os riscos de perdas nos rebanhos. Um dos principais fármacos utilizados no Brasil, que ainda apresenta eficácia nos rebanhos ovinos do país é a moxidectina (MOX), uma milbemicina pertencente à classe das lactonas macrocíclicas (Molento, 2009; Chagas, 2009).

A principal medida de controle dos nematoides gastrointestinais é a utilização de anti-helmínticos, drogas veterinárias com ação contra ecto e endoparasitas, sendo a moxidectina, a molécula dessa classe que mais vem ganhando destaque na ovinocultura no Brasil devido à sua longa persistência no organismo em baixas doses administradas (Molento, 2009; Chagas, 2009).

A utilização abusiva e/ou inadequada dos fármacos tem ocasionado a resistência parasitária dos nematoides e contribuído para a presença de resíduos desses compostos nos alimentos de origem animal destinados para consumo humano. A presença desses resíduos representa riscos à saúde humana devido à toxicidade, assim como potencial impacto ambiental e constitui entraves à exportação. Deste modo, a fim de orientar o controle dos nematoides gastrintestinais em pequenos ruminantes e minimizar a presença de resíduos dos fármacos nos alimentos, o produtor tem trabalhado com a premissa de apenas tratar os animais altamente parasitados e, deste modo, na seleção dos cordeiros que são geneticamente resistentes (Molento, 2005).

Quanto à decisão sobre a administração dos anti-helmínticos, três diferentes tratamentos têm sido empregados: o tratamento preventivo, onde o fármaco é administrado a cada 28 dias em todo o rebanho, mesmo sem o diagnóstico efetivo sobre a necessidade da aplicação, com o objetivo de evitar infecções clínicas ou subclínicas; o teste de contagem

de ovos por grama de fezes (o qual oferece uma estimativa da infecção) e o teste FAMACHA®. Este último identifica animais altamente parasitados pela análise da coloração da membrana conjuntiva (Sotomaior *et al.*, 2007; Van Wyk e Bath, 2002).

Para estimar a eficácia terapêutica do fármaco administrado busca-se determinar os parâmetros farmacocinéticos (PK), os quais determinam a quantidade do fármaco disponível no organismo para a geração de um efeito terapêutico adequado, obtendo assim, as melhores taxas de erradicação parasitária com os menores níveis de resistência da droga (Frimodt-Moller, 2002).

Para monitoramento desta lactona no soro de cordeiro, diversos métodos analíticos para a determinação de resíduos de MOX têm sido desenvolvidos, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência como técnica de separação, associada a detectores de fluorescência (Death *et al.*, 2011; Ballent *et al.*, 2011; Eraslan *et al.*, 2010) ou ainda, associada à espectrometria de massas (MS) (Turnipseed *et al.*, 2005; Rubensam *et al.*, 2011; Nope *et al.*, 2009; Ginanete *et al.*, 2011).

Na etapa de preparo de amostras, a maioria dos procedimentos de extração envolve o uso de acetonitrila para precipitação da proteína e remoção do analito, seguida por uma etapa de limpeza do extrato (Death *et al.*, 2011; Ballent *et al.*, 2011; Eraslan *et al.*, 2010).

Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um método para extração, quantificação e confirmação dos analitos por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS), a fim de determinar os resíduos de MOX no soro de cordeiros, servindo de base para o estudo farmacocinético e para comparação dos diferentes métodos de controle parasitário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ballent, M.; Lifschitz, A.; Virkel, G.; Sallovitz, J.; Maé, L.; Lanusse, C. 2011. In vivo and ex vivo assessment of the interaction between ivermectin and danofloxacin in sheep. *The Veterinary Journal* 192 (3): 422-427.
- Chagas, A.C. de S. 2009. Resíduos de anti-helmínticos no leite de caprinos. p. 603. In Cavalcante, A.C.R.; VIEIRA, L. da S. Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica.
- Death, C. E.; Taggart, D. A.; Williams, D. B.; Milne, R.; Schultz, D. J.; Holypake, C.; Warren, K. S. 2011. Pharmacokinetics of moxidectin in the southern hairy-nosed

- wombat (*lasiorhinus latifrons*). *Journal of Wildlife Diseases* 47(3): 643–649.
- Eraslan, G.; Kanbur, M.; Liman, B. C.; Cam, Y.; Karabacak, M.; Altinordulu, S. 2010. Comparative pharmacokinetics of some injectable preparations containing ivermectin in dogs. *Food and Chemical Toxicology* 48 (8-9): 2181–2185.
- Frimodt-Moller, N. 2002. How predictive is PK/PD for antibacterial agents? *International Journal of Antimicrobial Agents* 19 (4): 333-339.
- Giannetti, L.; Giorgi, A.; Necci, F.; Ferretti, G.; Buiarelli, F.; Neri, B. 2011. Validation study on avermectine residues in foodstuffs. *Analytica Chimica Acta* 700 (1-2): 11–15.
- Molento M.B. 2005. Avanços no diagnóstico e controle das helmintoses em caprinos. p.101-110. I Simpósio Paulista de Caprinocultura (SIMPAC). Multipress, Jaboticabal.
- Molento, M.B. 2009. Resistência Parasitária. p.603. In: Cavalcante, A.C.R.; Vieira, L. da S. et al. Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica.
- Noppe, H.; Verheyden, K.; Bussche, J. V.; Wille, K.; Brabander, H. 2009. Detection of macrocyclic lactones in porcine liver, meat and fish tissue using LC–APCI–MS–MS. *Food Additives and Contaminants* 26 (9): 1232-1238.
- Rubensam, G.; Barreto, F.; Hoff, R.B.; Kista, T.L.; Pizzolato, T. M. 2011. A liquid–liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 705 (1-2): 24–29.
- Sotomaior, C. S.; Carli, L. M.; Tangleica, L.; Kaiber, B. K.; Souza, F. P. 2007. Identificação de ovinos e caprinos resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais. *Resvita Acadêmica. Curitiba*. 5 (4): 397-412.
- Turnipssed, S. B.; Roybal, J. E.; Andersen, W. C.; Kuck, L. R. 2005. Analysis of avermectin and moxidectin residues in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using an atmospheric pressure chemical ionization/atmospheric pressure photoionization source. *Analytica Chimica Acta* 529 (1-2): 159–165.
- Van Wyk, J. A.; Bath, G. F. 2002. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research* 33 (5): 509-529.
- Viana, J. G. A. 2008. Panorama geral da ovinocultura no Mundo e no Brasil. *Revista Ovinos, Porto Alegre* 4 (12): 1-9.

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES SOBRE O USO DE MOXIDECTINA NA OVINOCULTURA E ASPECTOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE SEUS RESÍDUOS EM SORO DE CORDEIRO: UMA REVISÃO.

Artigo a ser submetido para publicação na revista Scientia Agricola

RESUMO

A ovinocultura é uma das principais atividades pecuárias desenvolvidas no Brasil e tem se expandido significativamente para várias regiões na última década. O seu crescimento é decorrente principalmente da produção de carne e do crescimento dos rebanhos de ovinos. O grande impasse nos sistemas de produção são as parasitoses gastrointestinais. Os problemas associados com os parasitas acarretam danos na saúde do animal, como redução de peso, perda do desempenho e capacidade reprodutiva, podendo inclusive levá-lo à morte. Como medida de controle dos nematoides faz-se uso dos anti-helmínticos, fármacos veterinários com ação contra ecto e endoparasitas. Todavia, o uso indiscriminado de medicamentos veterinários tem gerado resistência parasitária, podendo torná-los ineficazes em pouco tempo de uso. Assim, como medida de controle, o medicamento veterinário é comumente administrado baseado em duas formas de exame diagnóstico: contagem de ovos por grama de fezes e o teste FAMACHA® (examinação da mucosa ocular), ou a aplicação do composto em períodos regulares de 28 dias, independente de exame. A moxidectina é uma lactona macrocíclica que vem ganhando destaque devido à sua eficácia em baixas doses administradas e longa persistência no organismo dos animais tratados. Para determinação da MOX no soro de cordeiros, métodos analíticos simples e rápidos têm sido desenvolvidos baseados na extração com acetonitrila, *clean-up* por extração em fase sólida dispersiva empregando amina primária e secundária (PSA), e métodos de detecção do fármaco por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detectores de fluorescência ou espectrometria de massa. Assim, este artigo de revisão tem como objetivo apresentar aspectos econômicos relacionados com a criação de ovinos, parasitoses gastrointestinais e seu controle associado com os sistemas de produção comercial, e o contexto de uso atual de MOX, incluindo aspectos relacionados com métodos analíticos para a sua determinação.

Palavras-chave: ovinocultura, moxidectina, controle dos nematoides, métodos analíticos.

ABSTRACT

The sheep breeding has aroused great deal of interest in all regions of Brazil and its production is mainly intended to the production of lamb meat. However, the gastrointestinal parasitosis is one of the major difficulties in the production systems, especially in the field. Parasites cause animals' health damage, such as weight reduction, loss of performance and productive capacity, and can take them to death, reducing the profits of the producer. As a consequence parasiticides are used as prophylactic measure. Nonetheless, care on their use must be taken, since the indiscriminate use of veterinary drugs has favored the development of resistant strains, responsible for the loss of the drug effectiveness, even at little time of use. As a consequence, as a measure to control the gastrointestinal nematodes in the commercial sheep breeding, the veterinary drug is usually administered based on the result of two forms of diagnostic test: faecal egg count of parasites and the FAMACHA® test (examination of ocular mucosa color), or on the application of the veterinary drug at regular periods of 28 days, independently of any diagnostic test. Moxidectin (MOX) is a macrocyclic lactone that acts against endo and ecto-parasites, and has come to prominence in recent years due to its effectiveness at low doses and long persistence in the organism of animals. For MOX determination in the serum of lambs, simple and rapid analytical method has been developed based on acetonitrile extraction, extract cleanup employing dispersive solid phase extraction using primary and secondary amine (PSA), associated to a liquid chromatographic method with fluorescence detectors or mass spectrometry analyzer. In this regard, this review article aims to present economical aspects related to sheep breeding, gastrointestinal parasitosis and its control associated with the commercial production systems, and the context of current use of MOX, including aspects related to analytical methods for its determination.

Keywords: sheep breeding, moxidectin, nematodes control, analytical method.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a ovinocultura é uma atividade em grande desenvolvimento, justificado por investimentos crescentes na atividade e nas estratégias de conquistas de comercialização. Estas e outras ações culminaram no crescimento do número de estabelecimentos rurais com a presença de ovinos no Brasil, inclusive para locais onde antes a ovinocultura era insignificante (Vieira, 2003).

A ovinocultura está baseada, frequentemente, em um sistema de produção caracterizada por pastagens com altas lotações e, conseqüentemente, grande contaminação de larvas. As infecções por nematódeos gastrintestinais têm se constituído um importante entrave à expansão da ovinocultura de corte, destacando-se, como principal parasita, o *Haemonchus contortus* (Vieira, 2003).

A principal medida de controle dos nematódeos gastrointestinais é a utilização de anti-helmínticos, medicamentos veterinários com ação contra ecto e endoparasitas. A moxidectina, uma milbemicina pertencente à classe das lactonas macrocíclicas, é o antiparasitário que mais vem se destacando na ovinocultura no Brasil, na última década, devido à sua persistência no organismo em baixa dose (Molento, 2009; Chagas, 2009).

O uso prolongado ou indiscriminado dos fármacos tem ocasionado a resistência antiparasitária, contribuindo para a ineficácia do medicamento. Dentre as formas de melhorar o controle dos nematódeos, pode-se trabalhar com a premissa de apenas tratar os animais altamente parasitados, o que leva à seleção de cordeiros que são geneticamente resistentes. Para avaliação da carga parasitária, dois exames diagnósticos podem ser realizados: o exame regular de fezes no rebanho para fornecer uma contagem de ovos dos parasitos por grama de fezes (OPG), como estimativa da infecção, ou o exame da conjuntiva ocular de pequenos ruminantes, conhecido como teste FAMACHA® (Bath, Van Wyk, 2001). Outra prática comum é a desverminação de todos os animais do lote ou da propriedade em períodos regulares, em função de pequena porcentagem de animais com alta carga parasitária, objetivando evitar infecções clínicas ou subclínicas, o que leva à aplicação do medicamento em animais que não estão parasitados, aumentando os custos e podendo ocasionar a resistência parasitária (Molento, 2009).

Neste contexto, para garantir a eficácia dos tratamentos antiparasitários, busca-se o melhor entendimento das propriedades farmacocinéticas das drogas administradas. Os parâmetros farmacocinéticos (PK) permitem determinar a quantidade do fármaco disponível no organismo para geração de um efeito terapêutico adequado, obtendo-se assim, as melhores taxas de erradicação parasitária com os menores níveis de resistência (Frimodt-Moller, 2002).

Os estudos farmacocinéticos compreendem a administração do medicamento ao animal e a coleta de fluidos biológicos em tempos predeterminados, com posterior quantificação do fármaco, empregando-se método bioanalítico desenvolvido e validado para esta finalidade (Frimodt-Moller, 2002).

Para monitoramento do fármaco no soro de cordeiros, métodos analíticos que apresentem seletividade e sensibilidade adequadas devem ser desenvolvidos. Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a disposição da MOX no soro de cordeiros, assim como comparar os resíduos do fármaco no soro de animais submetidos a diferentes tratamentos antiparasitários em condições de criação no campo. Para tanto, foi desenvolvido e validado método analítico para determinação de MOX no soro por cromatografia líquida de alta eficiência e acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS). Estas informações são indispensáveis para uma maior segurança sobre a utilização dos produtos veterinários nos sistemas de produção.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ASPECTOS ECONÔMICOS DA OVINOCULTURA

A ovinocultura é a parte da Zootecnia que estuda a criação de ovinos. Segundo Calfat (2012), os ovinos são divididos em classes de acordo com a idade e o sexo, sendo classificados em: cordeiro, geralmente até 6 meses de idade de ambos os sexos, recém-desmamados ou em período de aleitamento; borrego, entre 6 meses e um ano de vida; ovelha, fêmea adulta com idade acima de um ano e carneiro, macho adulto com idade superior a um ano.

A produção mundial de carne ovina situa-se em torno de 14.200.000 toneladas/ano. Segundo a FAO (2009), a China destaca-se como o maior produtor de ovinos do mundo, seguida da Índia, Austrália e Nova Zelândia. Apesar de constituir-se no maior criador de ovinos, o comércio internacional é abastecido, predominantemente, pelos países da Austrália e Nova Zelândia, onde existem sistemas de produção e comercialização especializados para lã e carne (Figura 1). O principal destino para a exportação da carne ovina é a Comunidade Europeia. O Brasil contribui com menos de 1,0% da produção mundial de carne ovina, sendo detentor de 1,4% do rebanho mundial (FAO, 2009; Viana, 2008).

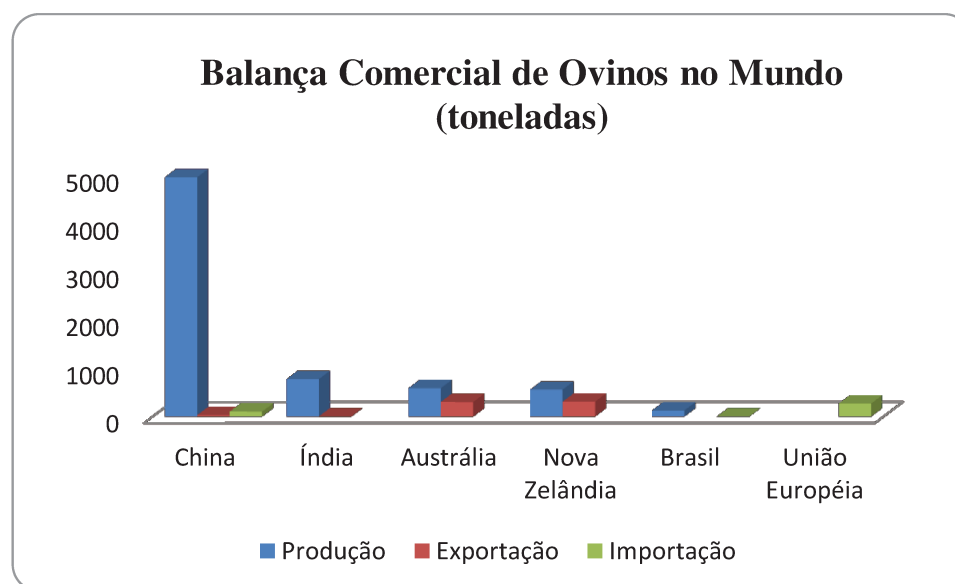


Figura 1. Balança comercial da ovinocultura no mundo.

Fonte: FAO, 2009.

Segundo o IBGE (2010), o número efetivo de ovinos no Brasil foi de 17.381 milhões de animais, registrando um aumento de 1,6 % em relação aos dados obtidos em 2009. A produção de carne ovina é uma atividade que vem se desenvolvendo gradativamente no Brasil, sendo caracterizada pela sua expansão para diferentes regiões, inclusive para locais onde antes a ovinocultura era insignificante. Este crescimento é impulsionado pelo aumento da demanda de produtos e subprodutos oriundos da cadeia produtiva, tanto para o mercado interno quanto externo. Do ponto de vista social, a

ovinocultura tornou-se mais uma alternativa para a geração de renda em pequenas propriedades rurais (IBGE, 2010).

O maior rebanho do país concentra-se no estado do Rio Grande do Sul com 22,9% do efetivo total. Já em termos regionais, o Nordeste se destaca como a região com o maior número de cabeças, com 56,72% em relação a todo o país. Nessa região, os maiores rebanhos encontram-se nos estados da Bahia (18,0%), Ceará (12,1%), Pernambuco (9,3%) e Piauí (8,0%) (Figura 2). O enfoque de grande parte da produção está voltado para a cidade de São Paulo, que é o maior e mais exigente mercado consumidor do país. Contudo, a produção brasileira de carne ovina não é capaz de abastecer a demanda interna desta cidade, de modo que uma parcela do produto consumido no país é importada (IBGE, 2010).

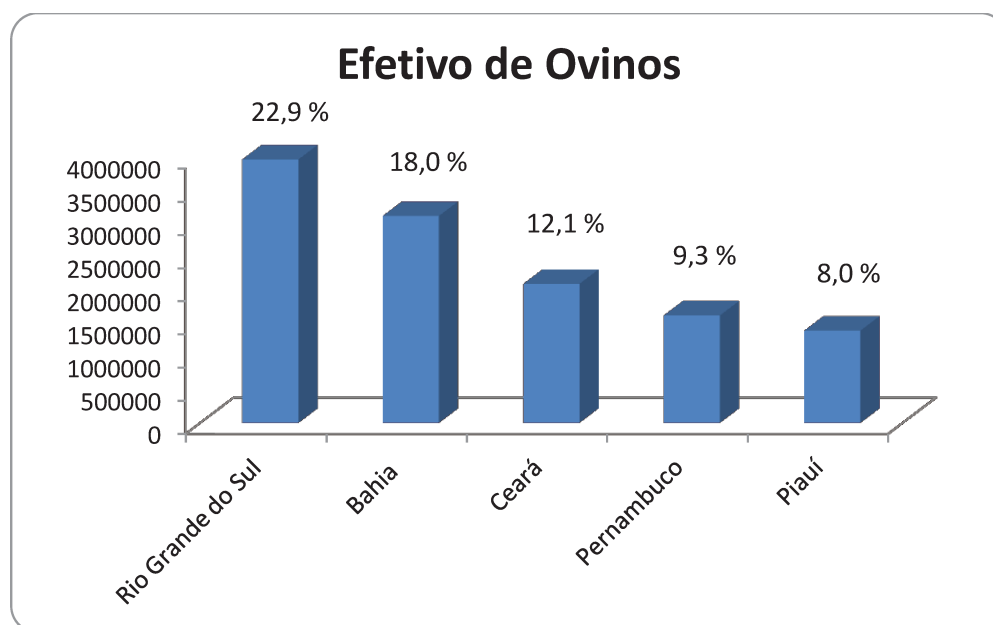


Figura 2. Produção de ovinos no Brasil.

Fonte: IBGE, 2010.

A demanda pela carne ovina concentra-se na produção de cordeiros, em virtude da maior maciez da carne. A carne do ovino adulto é menos atraente pelo aspecto, consistência e sabor, sendo mais utilizadas para o preparo de embutidos. Dentre as carnes vermelhas, a carne dos ovinos destaca-se por seu alto valor nutritivo, sendo rica fonte de proteínas, vitaminas do complexo B, ferro, cálcio e potássio. É fonte de proteínas de alta qualidade e

contém todos os aminoácidos essenciais, bastando 100 g de carne magra de cordeiro (que somam apenas 200 calorias) para satisfazer a metade das necessidades proteicas de um dia. Difere das carnes vermelhas, principalmente da carne bovina, por apresentar baixas concentrações de lipídios e, sobretudo, pela pequena quantidade de gorduras saturadas (Calfat, 2012), conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Informação nutricional de diferentes tipos de carnes de origem animal, em cada 100g de carne assada.

Origem	Calorias	Gorduras (g)	Gorduras saturadas (g)	Proteínas (g)	Ferro (g)
Caprino	131-165	2,76-3,75	0,85	18,1-25	3,54
Carneiro	252	17,14-32,8	7,82	14,4-24	1,50
Cordeiro	163	9,5	5,40	19,3	1,50
Bovino	244-263	17,14-18,12	7,29	18,7-25	3,11
Suíno	216-332	16,6-25,72	9,32	15,5-24	2,9
Frango	129	3,75	1,07	24-25	1,61

Fonte: DAIRY GOAT JOURNAL, 1996, citado por MOREIRA *et al.*, 1997.

Apesar dos benefícios no consumo da carne de ovinos, segundo Paulo Afonso Schwab, presidente da Associação Brasileira de Criação de Ovinos, o consumo per capita de carne ovina no Brasil é de apenas 400 gramas por pessoa, por ano, e está muito abaixo de outros tipos de carne, como a de aves que chega a 43,4 kg/ano, a bovina, que é de 37,4 kg/ano e a suína, que é de 14,1 kg/ano (Figura 3) (Viegas, 2012).

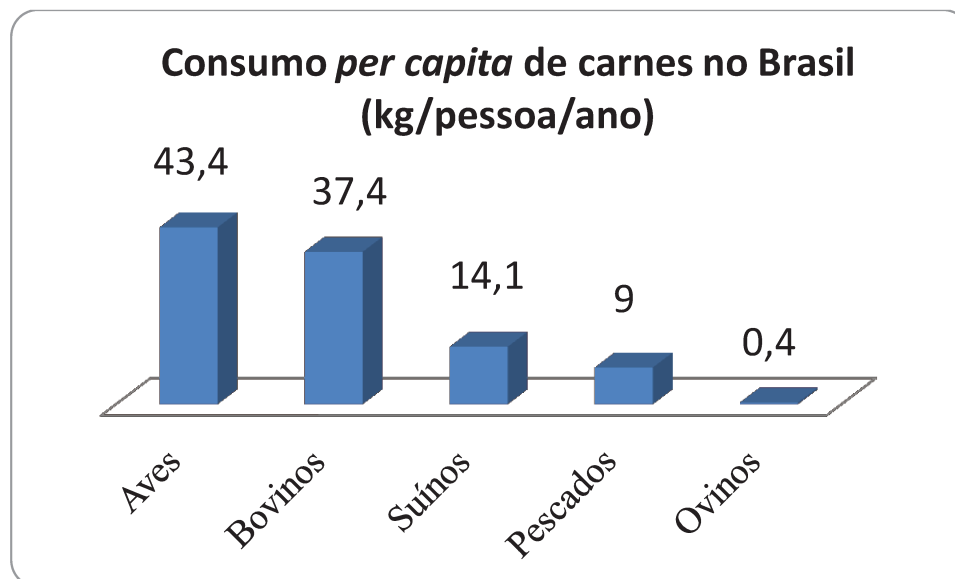


Figura 3. Consumo *per capita* nacional de carnes no Brasil.

Fonte: Viegas, 2012.

Em 2011, o consumo brasileiro de carne ovina alcançou 88,4 mil toneladas e desta quantidade, 74,4 mil toneladas foram provenientes do abate informal. A produção inspecionada, ou seja, o abate oficial, foi de apenas 6,1 mil toneladas e as importações chegaram a 7,8 mil toneladas. O presidente revela ainda que a carne ovina é pouco consumida no País em razão de uma série de fatores, como falta de hábito de consumo pela população, irregularidade da oferta, má qualidade do produto colocado à venda, em razão de boa parte vir do abate informal e a má apresentação do produto ao público (Viegas, 2012).

Segundo Calfat (2012), apesar do baixo consumo da carne ovina, a criação de cordeiros é uma das atividades mais promissoras do agronegócio nos dias atuais. O mercado cresce exponencialmente, com retorno rápido, e a tendência é de que se mantenha em expansão. Dentre os fatores, nos cenários nacional e internacional, que contribuem para essa vertente destacam-se as condições climáticas e a grande extensão territorial do país, favorável à criação da espécie, o fácil manejo, a alta eficiência de ganho de peso, os investimentos crescentes na atividade, as estratégias de conquistas de novos mercados e a mudança de atitude da população no que se refere à própria alimentação. Estima-se que, em

no máximo uma década, a carne de cordeiro será uma opção efetiva de proteína animal na mesa dos brasileiros (Viana, 2008).

ENDOPARASITOSE GASTROINTESTINAIS EM PEQUENOS RUMINANTES

Muito embora a produção de ovinos seja uma atividade pecuária extremamente promissora, existem vários fatores que limitam o aumento da produtividade, entre eles a infecção por nematódeos gastrointestinais (Vieira, 2003).

Vários levantamentos têm sido realizados no Brasil a fim de determinar as helmintoses de ocorrência em ovinos e caprinos. Na região Norte pode-se citar *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Cooperia curticei*, *Oesophagostomum columbianum* e *Trichuris spp* (Braga e Gibardi, 1991); na região Sul destacam-se *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Teladorsagia circumcincta*, *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia spp*, *Nematodirus spatigher*, *Oesophagostomum venulosum* e *Trichuris ovis* (Ramos *et al.*, 2004); na região Sudeste, observou-se a ocorrência de *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Oesophagostomum columbianum*, *Cooperia curticei* e *Strongyloides papillosus* (Amarante *et al.*, 2004) e na região Nordeste os ovinos albergam *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichostrongylus axei*, *Trichuris spp*, *Cooperia spp*, *Oesophagostomum columbianum*, *Strongyloides papillosus*, *Skirjabinema ovis*, *Bunostomum trigonocephalum*. Em todas as regiões citadas, o parasita predominante é o *Haemonchus contortus* (Silva *et al.*, 2003; Arosemena *et al.*, 1999).

O ciclo de vida de nematódeos gastrointestinais de ovinos é direto e pode ser dividido em fase parasitária e fase de vida livre (Figura 4). Os parasitas adultos localizam-se em um segmento do sistema gastroentérico, onde copulam e liberam ovos microscópicos que são eliminados nas fezes. Após alguns dias, esses ovos eclodem, iniciando o período de desenvolvimento das larvas, com a formação das subseqüentes mudas. Durante o período de chuvas ou o próprio pisoteio dos animais, possibilita-se que as larvas se espalhem pelo pasto e sejam encontradas nas partes mais altas das plantas da pastagem, onde são ingeridas pelos animais. Após a ingestão e desembainhamento no rúmen, as larvas sofrem duas mudas. Exatamente antes da muda final, desenvolvem a lanceta perfurante que lhes permite

a obtenção do sangue dos vasos da mucosa do abomaso, local de fixação do *Haemonchus contortus*. Quando adultos, movem-se livremente na superfície da mucosa (Urquhart *et al.*, 1998). A partir desse ponto o ciclo se repete.

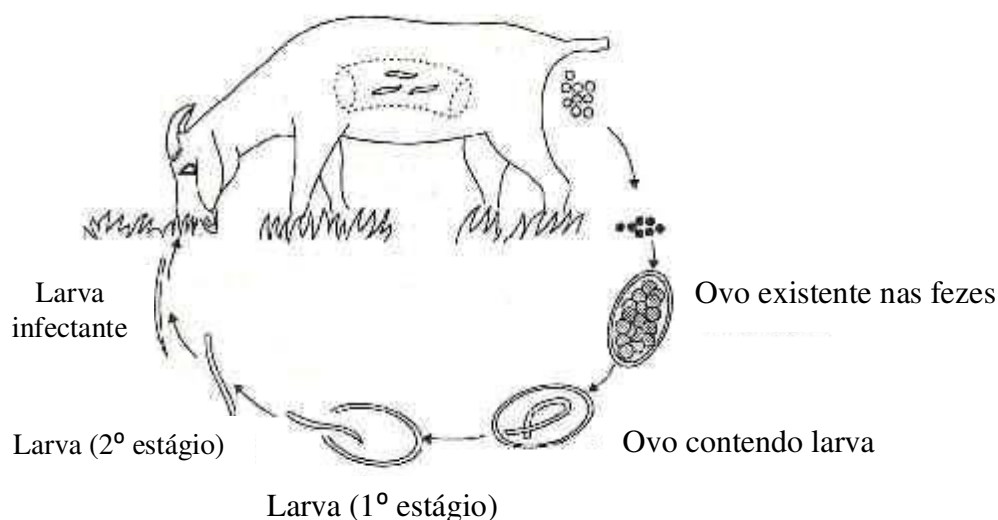


Figura 4. Ciclo evolutivo dos nematódeos gastrointestinais em ovinos.

Fonte: McManus *et al.*, 2011.

A epidemiologia do local é de extrema importância para o ciclo evolutivo completo das larvas. Urquhart *et al.*, (1998), ressaltam, como os elementos mais importantes para o desenvolvimento larval do ambiente externo, a temperatura (ótima entre 18 e 26 °C) e a umidade (ideal entre 80 a 100%), salientando que, em climas secos. O microclima das fezes ou da superfície do solo ainda pode ter umidade suficiente para permitir o desenvolvimento das larvas.

As helmintoses gastrintestinais, em especial *Haemonchus contortus*, constituem o principal fator limitante para a produção de ovinos no mundo inteiro (McManus *et al.*, 2011). As perdas causadas pelas verminoses são determinadas não somente pelos efeitos agudos da doença, que em muitos casos resultam em morte do animal infectado, mas, principalmente, pelos danos indiretos causados por infecções crônicas, acarretando desenvolvimento corporal lento, perda de peso, redução na produção de carne, leite e lã e

aumento das despesas associadas ao controle de doenças, especialmente nos animais jovens e debilitados como os cordeiros, que estão em fase de crescimento (Krychak-Furtado, 2006). A enfermidade e seus efeitos são mais evidentes em fêmeas paridas e animais jovens devido à baixa imunidade.

Para tratamento das infecções, faz-se uso dos anti-helmínticos, medicamentos veterinários com ação contra endo e ectoparasitas, garantindo a produção e evitando os riscos de perdas no rebanho. Embora a maioria das drogas, quando inicialmente comercializadas, sejam muito eficazes, nenhuma droga pode ser garantida para eliminar integralmente os parasitas presentes. Esses vermes residuais se multiplicam, criam resistência e transferem os genes para a próxima geração. O desenvolvimento da resistência a uma droga geralmente acontece dentro de cinco a oito gerações após a introdução da nova classe de composto, sendo aproximadamente um ano o intervalo máximo de uma geração de nematódeos gastrintestinais em ruminantes (Molento, 2009; Chagas, 2009).

Este problema potencial tem sido reconhecido e os agricultores são aconselhados a respeitar as recomendações dos fabricantes em relação às doses, aos intervalos de aplicação e ao tempo de carência. No entanto, esta recomendação tem sido amplamente ignorada devido à constância na oferta de produtos no mercado e à tentativa de elevar o ganho econômico na venda de cordeiros. Deste modo, a grande frequência de tratamentos contribui para a resistência dos parasitas e para a diminuição da vida útil do fármaco (Vieira, 2003; Hepworth *et al.*, 2006).

Em função da baixa eficácia de vários princípios ativos utilizados no Brasil (tal como a ivermectina, que já se apresenta ineficaz nos rebanhos ovinos do Sul do país, mesmo quando aplicada em até quatro vezes a dose recomendada), nos últimos dez anos outras substâncias começaram a ser utilizadas. No rebanho pertencente à Fazenda experimental da Universidade Federal do Paraná, a partir de 2002, em função da elevada resistência às avermectinas e aos benzimidazóis, adotou-se o uso de uma milbemicina (MOX) e de um composto substituto fenólico (nitroxinil) para o controle das parasitoses. Esses princípios, especialmente a MOX, têm sido adotados também pelos produtores e nas Cooperativas de produtores de carne ovina do estado do Paraná. O uso da MOX tem sido

constatado nos últimos dez anos em vários outros estados brasileiros, como São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (Molento, 2009; Chagas, 2009).

CONTROLE ANTI-HELMÍNTICO VERSUS RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA

Diversas estratégias têm sido estudadas no sentido de promover métodos que auxiliem no controle dos nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes. Desta forma, o Controle Integrado de Parasitos (CIP) vem sendo cada vez mais difundido. O CIP combina métodos de utilização de anti-helmínticos com métodos que não utilizam estes produtos, visando manter níveis aceitáveis de infecção em animais de produção (Molento, 2005).

Com relação à aplicação do CIP, diversas estratégias de controle vêm sendo estudadas na tentativa de contribuir com a diminuição da contaminação dos animais e pastos, entre as quais podem ser citadas: manejo dos rebanhos e da pastagem, nutrição, seleção de animais resistentes, controle biológico, vacinas, fitoterapia, a utilização de técnicas para avaliação do grau de infecção (Molento, 2005).

Dentre as estratégias de controle, o tratamento seletivo é um método comumente utilizado para decidir se os animais devem ser ou não tratados conforme o grau de infecção do animal. Para avaliar a carga parasitária, dois tipos de exames diagnósticos podem ser utilizados: a contagem de ovos por grama de fezes e o teste FAMACHA® (Sotomaior, 2007).

A realização regular dos exames de fezes em 10 a 20% do rebanho fornece uma contagem de ovos por grama de fezes (OPG), como estimativa da infecção (Tabela 2). Através do exame de OPG, pode-se realizar o teste de eficácia dos fármacos utilizados, os animais parasitados são distribuídos aleatoriamente em grupo tratado e grupo não tratado, ou controle. São necessários, no mínimo, dez animais para cada grupo a fim de permitir interpretação confiável dos resultados. Após 10 a 14 dias do tratamento, faz-se coleta de fezes diretamente do reto de cada animal e encaminha-se ao laboratório para a contagem de ovos nas fezes, comparando-se o percentual de redução na eliminação de ovos nas fezes nos dois grupos. O teste permite avaliar a eficácia de um vermífugo e decidir, conforme a

linha de corte estabelecida, se o animal deve ser ou não desverminado. Embora nem sempre o exame de fezes reflita com precisão a carga parasitária no animal e a gravidade da infecção, apresenta como vantagem sua facilidade de execução no campo. Atualmente, é consenso entre os pesquisadores que o mais importante é manter os animais com uma carga parasitária intermediária que permita o desenvolvimento da imunidade, mas sem comprometer a produção de carne, leite ou pele (Sotomaior *et al.*, 2007).

Tabela 2. Grau de infecção em ovinos conforme a carga parasitária para o *Haemonchus contortus*.

CARGA PARASITÁRIA (OPG)	INFECÇÃO
< 500	Leve
500 – 1.500	Moderada
1.501 – 3.000	Pesada
> 3.000	Fatal

OPG: Ovos por grama de fezes.

Fonte: Sotomaior *et al.*, 2007.

Outro método largamente utilizado é o FAMACHA®, este sistema foi idealizado para identificar, através da coloração da membrana conjuntiva, animais capazes de suportar uma infecção por *H. contortus* (parasita hematófago do abomaso), portanto, trabalha com a premissa de apenas tratar os animais altamente parasitados e deste modo direcionar o produtor para a seleção de cordeiros que são geneticamente resistentes (Kaplan *et al.*, 2004).

O exame se baseia na correlação da coloração da conjuntiva ocular de pequenos ruminantes comparando com cinco intervalos de anemia existentes em um cartão guia (Tabela 3), que auxilia no grau de anemia dos animais indicados pelo exame do hematócrito, que mede a percentagem de células vermelhas (Molento e Severo, 2004). Para a verificação da cor da mucosa ocular, o examinador deve expor a conjuntiva, pressionando a pálpebra superior com um dedo polegar e abaixando a pálpebra inferior com o outro dedo polegar. Deve-se evitar a exposição parcial da membrana interna da pálpebra (terceira pálpebra) e do olho. O ideal é observar a coloração na parte mediana da conjuntiva inferior,

comparando-a com as cores do cartão. Recomenda-se administrar o anti-helmíntico apenas aos animais que apresentem anemia clínica correspondente aos graus FAMACHA 3, 4 e 5 (Chagas *et al.*, 2007).

Tabela 3. Relação do grau FAMACHA com a coloração conjuntiva ocular e com o hematócrito.

Grau Famacha	Coloração	Hematócrito (%)	Atitude clínica
1	Vermelho robusto	> 27	Não tratar
2	Vermelho rosado	23 a 27	Não tratar
3	Rosa	18 a 22	Tratar!
4	Rosa pálido	13 a 17	Tratar
5	Branco	< 13	Tratar

Fonte: Molento e Severo, 2004.

Nos rebanhos ovinos observa-se grande diferença individual na capacidade de resistir ao desafio parasitário. Enquanto a maioria dos animais do rebanho possui contagens baixas de ovos nas fezes (OPG), ou não apresenta sinais clínicos de parasitismo, outros indivíduos apresentam-se anêmicos e altamente parasitados com grande frequência (Sotomaior *et al.*, 2007). Uma prática bastante comum entre os produtores é a de se recomendar a desverminação de todos os animais do lote ou da propriedade em função desta pequena porcentagem de animais com alta carga parasitária (Van Wyk e Bath, 2002). Trata-se do tratamento preventivo, com a aplicação de anti-helmínticos em todos os animais em períodos regulares, em datas preestabelecidas, com o objetivo de evitar infecções clínicas ou subclínicas. Contudo, a utilização da droga sem necessidade, na maior parte do lote, ocasiona o aumento da pressão de seleção sobre a população de helmintos (Molento, 2005).

LACTONAS MACROCÍCLICAS

Para os tratamentos das infecções gastrointestinais em ovinos são utilizados os seguintes grupos de anti-helmínticos: benzimidazóis e pró-benzimidazóis; imidotiazóis; tetrahidopirimidinas; salicilanilidas; avermectinas e milbemicinas, e organofosforados (Lanusse, 1996; Ayres e Almeida, 1996).

As lactonas macrocíclicas (LMs) correspondem às drogas mais amplamente e rotineiramente utilizadas no mundo para a prevenção e controle de um amplo espectro de doenças parasitárias, tais como nematódeos, vermes intestinais, artrópodes, ácaros, piolhos, carrapatos, entre outros. A razão de sua preferência é decorrente de serem endectocidas (ação contra endo e ectoparasitas) extremamente eficazes em baixas concentrações (Durden, 2006).

As LMs são compostos orgânicos derivados da fermentação de fungos actinomicetos do gênero *Streptomyces*, presentes no solo (Spinosa, 1995). Apresentam uma estrutura molecular comum de 16 elementos, incluindo o grupamento éster, conferindo a classificação de lactona. Também possuem um anel espiroacetal (C17 a C25), e principalmente um anel benzofurânico (C2 a C8) como subestruturas, da qual derivam seu mecanismo de ação e propriedades farmacológicas similares (Figura 5) (Lifschitz *et al.*, 2002).

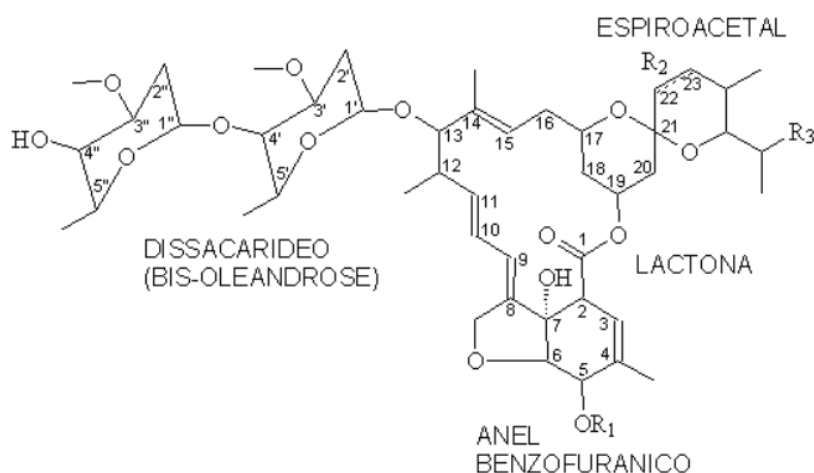


Figura 5. Estrutura comum à família das lactonas macrocíclicas.

Fonte: Rubensam, 2010.

Os compostos macrocíclicos estão estruturalmente divididos em dois subgrupos: as avermectinas e as milbemicinas. Ao subgrupo das avermectinas pertencem a ivermectina (IVM), a abamectina (ABM), a doramectina (DOR), a eprinomectina (EPR), a emamectina (EMA) e a selamectina; as milbemicinas (também chamadas de nemodectinas) incluem a milbemicina oxima, milbemicina B41 D, a MOX e a nemadectina (NEM) (Figura 6). (Durden, 2006; Sumano e Ocampo, 2006).

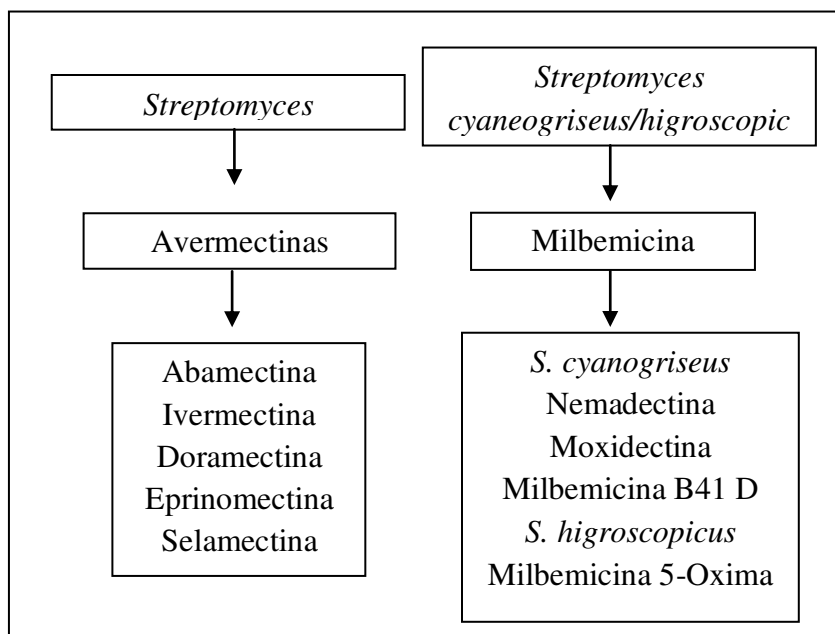


Figura 6. Subgrupos das Lactonas.

Fonte: Lifschitz *et al.*, 2002.

As avermectinas são isoladas a partir de culturas de *S. avermitilis*, enquanto as milbemicinas são isoladas a partir de *S. cyanogrise* ou *S. hygroscopicus*. Os subgrupos se diferem quanto à presença de um dissacarídeo na posição C13, existente somente no grupo das avermectinas, permitindo diferenciá-las e determinar variações no comportamento farmacocinético, na potência e persistência dos efeitos antiparasitários. As LMs são moléculas de tamanho grande, com um peso molecular de 600 kDa (milbemicinas) e 800 kDa (avermectinas) (Figura 7). (Shoop *et al.*, 1996).

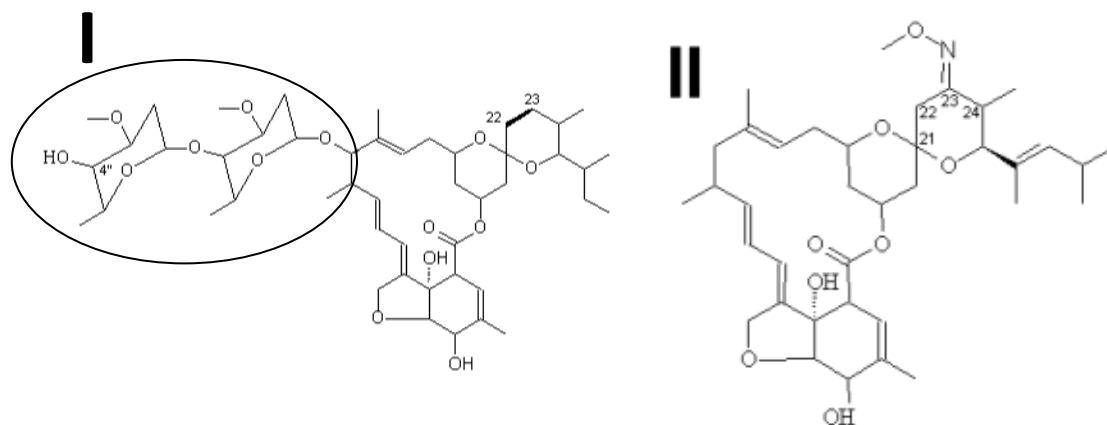


Figura 7. Diferenças estruturais entre avermectinas (I) e milbemicinas (II).

Fonte: Rubensam, 2010.

Mecanismo de ação

As LMs possuem afinidade com os canais de cloro controlados por dois neurotransmissores: o ácido gama amino-butírico (GABA) presente no sistema nervoso central de invertebrados e vertebrados e o glutamato, presente nas membranas neurais e musculares de muitos invertebrados (Maddison *et al.*,2010).

Na presença das LMs, ocorrerá a ativação direta dos canais de cloro, acarretando um aumento da permeabilidade de íons cloreto. Devido à concentração de cloro ser maior fora da célula e consequentemente abertura de regiões da membrana que permitem a passagem dos íons de cloro, o fluxo de íons cloreto negativamente carregados para o lado intramembranoso tenderá a hiperpolarizar a membrana. Esta hiperpolarização resulta na diminuição do potencial de repouso normal das células pós-sinápticas, tornando mais difícil a neurotransmissão dos estímulos e assim, as células não se contraem. Sob a influência das LMs, os parasitas ficam paralisados e, consequentemente, são expelidos (Maddison *et al.*,2010).

As ações nos músculos dos parasitas incluem paralisia da bomba faríngea, necessária para o consumo de alimentos, resultando em inanição. A combinação de efeitos musculares e neurais provavelmente está envolvida na atividade biológica das LM. Uma

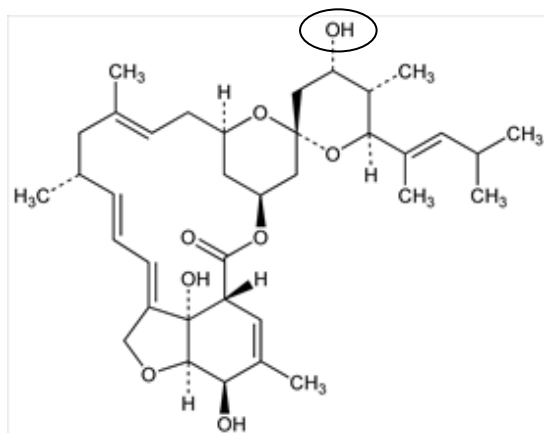
ausência de sítios ativos em cestódeos e trematódeos torna esses parasitas insensíveis à ação das LM (Maddison *et al.*, 2010).

Em baixas concentrações, as lactonas potencializam a ação dos neurotransmissores e em altas concentrações, produzem diretamente a abertura do canal de cloro, com diferenças farmacodinâmicas muito sutis entre os grupos. Embora os mamíferos utilizem o GABA como neurotransmissor, as avermectinas e as milbemicinas não causam efeitos tóxicos neles, pois, por apresentarem alta massa molecular, não atravessam a barreira hematoencefálica e, portanto, não atuam no sistema nervoso central (Maddison *et al.*, 2010).

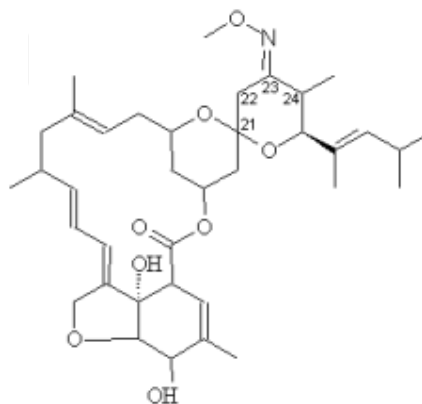
Moxidectina

A MOX é também chamada de milbemicina B ou O-(metoximino). Esta substância foi introduzida no mercado no início dos anos 90, no Japão, como um potente agente antiparasitário para o controle e tratamento de parasitas internos e externos em animais, cuja carne seja destinada para o consumo humano. O fármaco é eficaz contra nematódeos e artrópodes, mas possui ação nula contra céstodos e tremátodes porque estes carecem do neurotransmissor mediado pelo GABA (Sumano e Ocampo, 2006).

O composto é obtido por modificação química da nemadectina, uma milbemicina obtida naturalmente pela fermentação da cultura do fungo *Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus*, e apresenta uma substituição do grupamento hidroxila no C-23 por um grupamento metiloxima (Figura 8) (Sumano e Ocampo, 2006).



NEMADECTINA



MOXIDECTINA

Figura 8. Diferenças estruturais entre nemadectina e moxidectina.

Natureza química e farmacocinética da moxidectina

Essa substância, na sua forma mais pura, é um sólido pó branco, de alto peso molecular. Por não possuir a fração dissacarídica na estrutura, apresenta elevados coeficientes de partição ($K_{o/w}$), caracterizando-a como substância lipofílica. Estas substâncias são consideradas mais lipofílicas e hidrofóbicas que as avermectinas. O composto é praticamente insolúvel em água e solúvel em compostos orgânicos (FDA, 1997; FDA, 1998).

O comportamento farmacocinético das lactonas é significativamente afetado pela rota de administração. A MOX pode ser administrada por dose oral ou formulação injetável no tecido subcutâneo ou intramuscular. A biodisponibilidade dos endetocidas por administração oral resulta em baixa eficácia devido à inativação parcial da droga no rúmen dos ovinos (Alvinerie *et al.*, 1998).

Após a sua administração, as drogas são distribuídas por todo o corpo através da circulação do sangue e têm de se propagar para o tecido alvo para exercer o efeito sistêmico. A concentração que atinge o tecido alvo depende da capacidade para penetrar o endotélio capilar e se difundir através das membranas celulares. Devido à alta lipofilicidade, as lactonas macrocíclicas são extensamente distribuídas através do corpo por difusão passiva e, conseqüentemente, são absorvidas por todas as vias corporais, o que lhes

confere perfil farmacocinético de alto volume de distribuição tissular (Alvinerie *et al.*, 1998; Sumano e Ocampo 2006).

Um dos fatores que afetam a eficácia do fármaco no tecido alvo é a presença de uma proteína inibidora, a P-glicoproteína (Pgp), no sistema nervoso de mamíferos. Trata-se de uma proteína transmembranosa responsável pelo efluxo de vários xenobióticos para fora da célula. Esta proteína previne o acúmulo intracelular e os efeitos citotóxicos da droga (Lanusse *et al.*, 2008).

As comparações da afinidade de LMs para P-gps demonstram que MOX é um substrato pobre para as P-gps e difere nesta propriedade por uma ordem de magnitude das avermectinas. Essas diferenças de afinidade desempenham um importante papel de seleção. A ivermectina é um excelente substrato para o mecanismo de efluxo realizado pela P-gp dos mamíferos. A partir deste fato, os parasitologistas iniciaram investigações buscando saber se os parasitas resistentes a ivermectina usavam mecanismo similar para protegê-los da ação das lactonas macrocíclicas, o que foi demonstrado por Xu *et al.*, (1998), que encontraram um isolado de *H. contortus* selecionado para ivermectina que possuía uma alta expressão de P-glicoproteína A (Pgp A), comparado com um isolado parental não selecionado. A Pgp A é uma P-glicoproteína encontrada em *H. contortus* (Prichard, 2007).

A MOX armazena-se principalmente no tecido gorduroso, sendo o principal reservatório a gordura abdominal e subcutânea, mas também está presente na luz intestinal e na pele do animal. O depósito da MOX no tecido adiposo atua como um reservatório da droga, liberando-a para a corrente sanguínea gradualmente. Este fato contribui para a persistência da atividade da molécula nos tecidos alvos e para a meia vida longa (Entrocasso *et al.*, 1996). Inversamente, uma baixa concentração da droga é encontrada no tecidos magros, como o músculo, apresentando um baixo tempo de residência. O tempo de residência prolongado da MOX proporciona um impacto positivo na eficácia, como demonstrada pelo maior intervalo para o reaparecimento de parasitas após o tratamento, quando comparado com outros compostos, minimizando a oportunidade para o desenvolvimento de resistência (Lifschitz *et al.*, 1999).

Os animais jovens, por apresentarem menor teor de gordura no corpo quando comparados com o animal adulto, tendem a armazenar menor quantidade do composto; o

mesmo raciocínio é utilizado ao se comparar as fêmeas com os machos, observando-se que as fêmeas tendem a armazenar maior teor de gordura corporal, influenciando no armazenamento e metabolização do fármaco (Alvinerie *et al.*, 1998). Com relação ao consumo da carne, o cordeiro é a categoria de maior preferência devido à idade e à correlata maciez da carne, conforme foi citado; além disso, normalmente deve-se abater mais machos do que fêmeas, devido a necessidade de crescimento de rebanhos no país. Isso indica que o consumo da carne pode estar privilegiado, considerando o aspecto da concentração do composto.

A MOX é metabolizada em baixa proporção no fígado em C29 e C14, metabólitos mono-hidroxi, com o envolvimento da via 3A do citocromo P450, sendo secretada pela bile, reabsorvida pelo intestino e eliminada na sua forma ativa através das fezes. Esta é a principal via de excreção e somente uma pequena fração será eliminada pela urina (FDA, 1997; Lifschitz *et al.*, 1999). Em razão de sua lipofilicidade, a MOX apresenta longo período de excreção, resultando em maior exposição da droga no ambiente.

Em um estudo farmacocinético em ovinos, após a administração subcutânea, Dupuy (2003) detectou a presença da MOX nos tecidos por um período de até 15 dias após a administração, alcançando a concentração máxima da droga no plasma (14,49 ng/ml) em 0,29 dias. As concentrações na mucosa abomasal, intestinal e na pele foram maiores do que as encontradas no plasma ($p < 0,01$). De acordo com o autor, essa permanência da droga nos diferentes tecidos assegura a eficácia da droga contra diversos endo e ectoparasitas em ruminantes.

Em bovinos, o tempo de meia vida da MOX após administração subcutânea é de três dias na corrente sanguínea, nove dias no músculo, 11 dias no fígado e rim, e 14 dias na gordura, superando o tempo da ivermectina que é de 7 dias (Dupuy, 2003).

Devido ao elevado ponto de ebulição e pressão de vaporização, a MOX não é volátil, evitando assim a sua dispersão para atmosfera e aumentando a sua estabilidade. Apresenta sensibilidade moderada à temperatura, sendo decomposta próximo ao seu ponto de fusão. Essa substância também apresenta estabilidade em condições moderadamente ácidas (pH entre 4,0 e 4,6). Porém, há combinações de temperatura, pH e tempo de

exposição em que pode sofrer hidrólise na subestrutura bis-oleandrose no C13. As características físico-químicas citadas podem ser visualizadas na Tabela 4 (FDA, 1998).

Tabela 4. Propriedades físico-químicas da moxidectina.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	
Peso molecular	639,8 g/mol
Fórmula Molecular	C ₃₇ H ₃₃ NO ₈
Ponto de ebulição	145 -154 °C
Ponto de vaporização	<10 ⁷ torr
Absorção do espectro no Ultravioleta – visível	245 nm
Coefficiente de partição	Kow = 58,3
Solubilidade em água	0,51 mg/L
Solubilidade em solventes orgânicos (mg/L)	
Dietil diclorometano	1,64
Éter	1,19
Etanol (95%)	0,81
Acetonitrila	0,62
Etil acetato	0,447

Fonte: FDA, 1998.

MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DA MOXIDECTINA

Os métodos de determinação de resíduos de fármacos veterinários nos fluidos corporais compreendem, basicamente, três etapas: a primeira etapa consiste na amostragem, que deve ser representativa do todo; a segunda é o preparo da amostra, isto é, a extração do

analito da matriz, purificação dos extratos através da remoção de interferentes (*clean-up*) e a pré-concentração dos extratos a fim de ajustar as concentrações dos analitos ao nível de detecção dos aparelhos; a terceira etapa se trata da separação, identificação e quantificação do(s) analito(s) presente(s) nas amostras por técnicas instrumentais, sendo a principal técnica utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Todas estas etapas são críticas e podem influenciar nos resultados das análises (WHO, 2004).

Procedimento para extração do analito da matriz

O preparo da amostra é uma das etapas mais importantes e laboriosas requeridas para isolar traços de constituintes presentes em matrizes biológicas complexas, como fluidos e tecidos de animais. Para o desenvolvimento do preparo de amostra, deve-se levar em consideração o tipo de matriz de trabalho e as características físico-químicas dos analitos a serem determinados, com vistas a se buscar a melhor seleção possível dos reagentes envolvidos nos processos analíticos (WHO, 2004).

Em geral, a extração das lactonas das diferentes matrizes é realizada utilizando-se solventes orgânicos de média a baixa polaridade, sendo o mais comumente utilizado a acetonitrila (Bradley *et al.*, 2012; AntoniĆ *et al.*, 2011; Death *et al.*, 2011; Ballent *et al.*, 2011; Perez *et al.*, 2010) (Tabela 5). A escolha da acetonitrila como solvente inclui a capacidade de solubilizar as lactonas macrocíclicas e precipitar as proteínas, além de ser compatível com análises cromatográficas em fase reversa e analisadores de massas.

Após a adição do solvente orgânico (como acetonitrila ou metanol), o analito que se encontrava agregado às proteínas se deslocará para o solvente, com a subsequente eliminação das proteínas plasmáticas por precipitação. Esta precipitação é favorecida durante o processo de centrifugação, preferencialmente a baixas temperaturas. A precipitação de proteínas é um procedimento simples, de baixo custo e rápido, porém pouco eficiente na eliminação dos interferentes (Barrionuevo e Lanças, 2001).

A remoção dos analitos de interesse da amostra está relacionada com a eluição concomitante de muitos componentes indesejáveis da matriz que podem interferir na análise, como compostos lipofílicos, sais minerais, entre outros. Para reduzir os

indesejáveis efeitos de matriz, os extratos devem ser purificados pela retirada dos interferentes, em um processo conhecido como *clean-up* (Barrionuevo e Lanças, 2001).

Tradicionalmente as etapas de *clean-up* relatadas na literatura (Tabela 5) empregam a extração em fase sólida (SPE), a qual utiliza cartuchos ou colunas que contêm um sorvente sólido para adsorção dos analitos presentes na matriz aquosa e, posteriormente, os analitos de interesse são eluídos com um solvente orgânico. As etapas da extração por SPE resumem-se na ativação do sorvente, percolação da amostra/sorção dos analitos no sorvente, eliminação dos interferentes da matriz (*clean up*), eluição dos analitos e posterior concentração do composto de interesse, conforme ilustradas na Figura 9 (Caldas *et al.*, 2011).

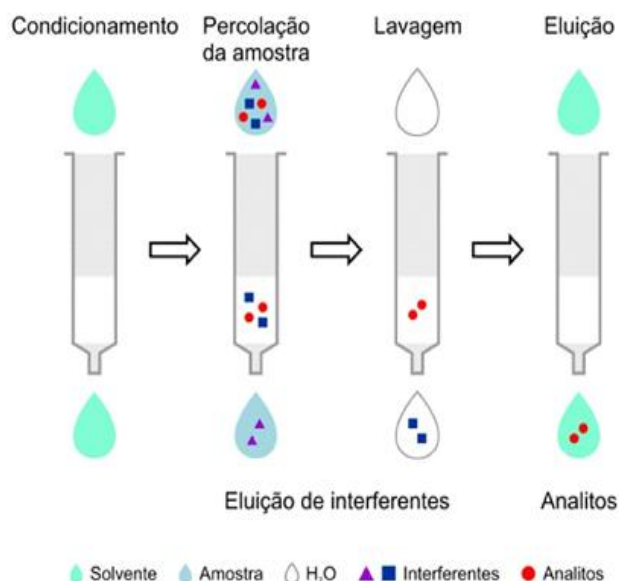


Figura 9. Ilustração da técnica por SPE.

Em uma revisão de métodos para determinação de lactonas macrocíclicas realizada por Danaher *et al.*, (2000), foi observado que a maioria dos cartuchos utilizados para extração baseavam-se no polímero de fase reversa C18. Em um estudo realizado por Farer *et al.*, (1999), o qual analisou 4 diferentes métodos de SPE (troca catiônica, sílica, C18 e C8) para análise de lactonas macrocíclicas, os autores comprovaram que o cartucho C18 fornecem melhores níveis de recuperação e retenção dos analitos.

A técnica por SPE envolve uma operação manual com o uso de diferentes solventes para lavagem do sorvente, etapas de evaporação e secagem. Muitos fatores afetam a precisão quando se trabalha com SPE, entre eles o ajuste do sistema de vácuo e o fluxo dos solventes. A escolha do tipo e quantidade de sorvente, volumes da amostra, do solvente para ativação dos cartuchos e para a eluição dos analitos também são parâmetros que devem ser considerados. Esta técnica, apesar de simples, é trabalhosa e demorada, o que implica em um maior tempo de análise. Quando automatizada requer manutenção frequente, além de representar um custo considerável em cartuchos (Caldas *et al.*, 2011).

Como alternativa, o método por QuEChERS ("rápido, fácil, econômico, eficiente, robusto e seguro") tem sido muitas vezes preferido em comparação com outras técnicas de preparo de amostra, incluindo a técnica por SPE, por ser um método capaz de fornecer extratos mais limpos, com recuperações elevadas, por minimizar a quantidade de solventes orgânicos utilizados, por reduzir o volume de resíduos gerados, e ser de fácil execução, elevada rapidez, robustez e segurança (Whelan *et al.*, 2010).

A abordagem pelo método QuEChERS baseia-se na extração dos analitos de diferentes polaridades com um solvente orgânico (geralmente ACN), seguida de uma partição líquido-líquido em duas fases: a orgânica e a aquosa. A partição é executada com a ajuda de sais (sulfato de magnésio, cloreto de sódio e/ou acetato de sódio) e agentes tamponantes (citrato de sódio) para induzir a transferência dos analitos para a fase orgânica que é, em seguida, purificada por uma extração dispersiva em fase sólida (SPE-d). Os adsorventes comumente empregados são uma amina secundária e/ou primária (PSA) e o adsorvente octadecil (C18). O sorvente PSA tem a função de remover açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmentos; o C18, grupos lipofílicos. A separação das duas fases ou compartimentalização dos analitos entre eles é otimizada com o tipo e quantidade de sais adicionados (Anastassiades *et al.*, 2003).

O emprego de acetonitrila como solvente de extração no método QuEChERS proporciona uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra, além de ser compatível com o cromatógrafos líquido e gasoso. No desenvolvimento do método QuEChERS, o sal secante comumente empregado para remoção da água é o sulfato de magnésio (MgSO_4). A escolha do MgSO_4 deve-se a maior capacidade de remover a água

quando comparado a outros sais, além de reduzir o volume de fase aquosa. A sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45°C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares (Anastassiades *et al.*, 2003).

Após a extração e *clean-up*, o sobrenadante é evaporado por rota-evaporação, evaporação por fluxo de nitrogênio (45-50°C), entre outros, que ajudam na diminuição do volume final obtido. A amostra pode ser então ressuspensa em volume adequado para ajustar a concentração de trabalho e facilitar a injeção cromatográfica da amostra.

Tabela 5. Métodos para o preparo de amostra

Analito	Matriz	Extração	Clean-up	Rec. (%)	FE e FM	Det.	LOD ng mL ⁻¹	LOQ ng mL ⁻¹	REF.
MOX	Plasma humano	200 µL ACN 40µL H ₂ O	SPE	84.6	BondaPak™ C18 (10 µm, 300× 3,9 mm) ACN/ Tetraidrofurano/H ₂ O (40:40:20, v/v/v).	FLD	-	0,08	Bradley <i>et al</i> 2012
IVE, DOR	Plasma ovino	16mL ACN	SPE C8	98 IVE 106 MOX	Supelcosil LC-8-DB 3µm (150 × 4.6mm) ACN, MeOH, H ₂ O (465:465:70, v/v/v)	FLD	-	0,02 IVE 0,05 MOX	Antonić <i>et al</i> 2011
MOX	Plasma de marsupial	200 µL ACN 100 µL de H ₂ O	-	95	Alltech Alltima HP C18 (2,1 x 50 mm; 3µm) ACN:Água: Ácido fórmico (90:10:0,1 v/v/v)	ESI Triplo Quadrupolo	-	1,0	Death <i>et al</i> 2011
IVE	Plasma de ovino	1 mL ACN	SPE C18	>73	Phenomenex C18 (5µm; 4,6x250 mm) ACN/MeOH/H ₂ O (55:40:5 v/v/v)	FLD	-	0,2	Ballent <i>et al</i> 2011
DOR	Plasma de cavalo	1mL ACN, 0,25 mL H ₂ O	SPE C18	86,4 ±6,3	Supelcosil C18 (5µm; 4,6mm x 150 mm). Ác. Acetic (0.2% em H ₂ O)/ MeOH/ACN (4:32:64, v/v/v)	FLD	-	0,1 ng/mL	Perez <i>et al</i> 2010

Tabela 5. continuação

Analito	Matriz	Extração	Clean-up	Rec. (%)	FE e FM	Det.	LOD ng mL ⁻¹	LOQ ng mL ⁻¹	REF.
IVE	Plasma canino	1 mL ACN	5 mL of chlorofórmio	87,73	100% ACN IVM, ACN/H ₂ Owater (99.5:0.5) DRM, ACN/MeOH (65:35) MXD C18 Luna (3 µm; 150 x 4,6 mm)	FLD	0,16 ng/mL	0,40 ng/mL	Eraslan <i>et al</i> 2010
IVE	Plasma de cavalo	0,5 mL ACN	SPE C18	83,57 ± 4,12	ACN/ MeOH (66:34, v/v)	FLD	0,05 ng/mL	0,18 ng/mL	Gokbulut <i>et al</i> 2010
IVE	Plasma caprino	0,5mL ACN	SPE C18	82.43 ± 3.25	Nucleosil C18 (4,6 x 150 mm; 3µm) ACN:Metanol (66:34 v/v)	FLD	0,05	0,18	Gockbulut <i>et al</i> 2009
IVE	Plasma ovino	1 mL ACN e 0,25mL de água deionizada	SPE C18	>70	C18 (4,6 x 250 mm; 5µm) Ácido acético (0,2% em água)– metanol–ACN (2,4:40:57,6 v/v/v)	FLD	-	0,2	Lifschitz <i>et al</i> 2009

Onde: Rec – Recuperação; FM – Fase móvel; FE – Fase estacionária; DET – Detector; LOD – Limite de detecção; LOD – Limite de quantificação; Ref – Referência.

Métodos para a detecção da moxidectina

Para quantificação e confirmação da identidade de um grande número de substâncias, incluindo a maioria dos antimicrobianos, atualmente a cromatografia líquida (LC) acoplada a diferentes detectores é a técnica analítica mais utilizada (Turnipseed *et al.*, 2005; Inoue *et al.*, 2009, Noppe *et al.*, 2009).

A cromatografia baseia-se em um método de separação físico-químico, no qual os constituintes da amostra são particionados em duas fases: uma fase estacionária, imiscível e fixa, contendo um adsorvente; e uma fase móvel que percola através da primeira. Conforme a interação dos constituintes da amostra com as fases, os componentes apresentarão diferentes mobilidades no sistema, propiciando a formação de bandas ou zonas de separação dos analitos e, conseqüentemente, tempo de retenção diferenciados (Collins *et al.*, 1997).

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de ultramicroanálise capaz de detectar substâncias a níveis traço quando utilizados detectores de fluorescência ou analisadores de massa (Ciolla, 1998; Niessem *et al.*, 2006) A escolha do detector depende do atendimento das características desejadas, ou seja, alta sensibilidade, alta seletividade, linearidade, baixo limite de detecção e estabilidade frente às mudanças na composição da fase móvel e na temperatura (Collins *et al.*, 1997).

Embora tenham sido descritos métodos para a análise das LMs utilizando LC por espectrometria de massa, a técnica de detecção por fluorescência ainda é o método mais amplamente aplicado em amostras de plasma (Tabela 5), por sua superioridade em relação ao limite de detecção (LOD) e ao limite de quantificação (LOQ), bem como à maior sensibilidade, melhor reprodutibilidade (precisão) dos dados e o menor custo do LC-FLD (Rupp *et al.*, 1998).

O detector de fluorescência monitora apenas os compostos que fluorescem, ou seja, que possuem a capacidade de emitir um sinal luminoso ao retornarem para o estado fundamental. Uma alta intensidade fluorescente é esperada para compostos conjugados simetricamente, ou que não podem produzir estruturas fortemente iônicas (Collins *et al.*, 1997).

A fluorescência também pode ser desenvolvida em composto não fluorescentes por reações pré ou pós-coluna. Este é o caso das LMs, que produzem substâncias fluorescentes de absorção em 365 nm e emissão em 470 nm ao reagirem com um ácido forte, como o anidro acético (AA) ou anidro trifluoroacético (TFAA), na presença de um catalisador básico e uma base orgânica que pode ser a pirimidina (PI), a trietilamina (TEA) ou o 1-metilimidazol (MI). Posteriormente o fluoróforo é formado por desidratação química do fármaco original, com o ataque irreversível às hidroxilas (Danaher *et al.*, 2006).

Muitos autores afirmam que a formação do derivado fluorescente é problemático do ponto de vista da estabilidade, por ser biodegradável com o tempo. A EPR é particularmente problemática, pois a reação de derivatização é lenta, muitas vezes incompleta e bastante instável. Até recentemente, o modo preferido de detecção das LMs estava baseado na derivatização pré-coluna, o qual permite a separação cromatográfica e a detecção dos compostos baseada na fluorescência (Danaher *et al.*, 2006; Turnipced *et al.*, 2005).

No entanto, os rigorosos requisitos para a confirmação de resultados positivos requerem o uso de detector por espectrometria de massa (EM). A EM é uma técnica seletiva, baseada na determinação pela razão massa/carga (m/z) do analito. Deste modo, a quantificação por fluorescência e confirmação por espectrometria de massa representa o fluxo de trabalho empregado em grande parte dos laboratórios envolvidos com a análise de resíduos de LMs. Este fato contrasta com as estratégias de controle de resíduos de drogas veterinárias, as quais comumente detectam, quantificam e confirmam os resultados baseando-se em um único passo de espectrometria de massa por tandem (LC-MS/MS), como na análise das tetraciclinas, quinolonas e sulfonamidas (Durden, 2006).

A espectrometria de massa é uma ferramenta alternativa para o desenvolvimento de métodos mais rápidos e sem a necessidade de derivatização dos analitos, os quais tendem a ser instáveis e exigem processos laboriosos de preparo de amostra. A EM permite trabalhar com um preparo de amostra mais simples, requerendo poucos passos de purificação, além de possibilitar a análise quantitativa e confirmatória de analitos em uma grande variedade de matrizes. Atualmente é a técnica analítica mais aceita pela Comunidade Europeia para a

determinação de resíduos de antimicrobianos em tecidos e fluídos biológicos (Kinsella *et al.*, 2009).

Contudo, a análise das LMs por LC-MS/MS ainda não atingiu o mesmo nível de maturidade alcançada para a maioria dos medicamentos veterinários. Este fato pode ser provavelmente explicado por suas propriedades físicas e químicas. As LMs são compostos pesados, com um peso molecular que varia entre 600 e 900 Da. Apesar das suas massas relativamente elevadas, a maioria das LMs contém apenas um átomo de nitrogênio no interior da sua estrutura química. Alguns medicamentos, como a doramectina, ivermectina e abamectina não contém quaisquer heteroátomos além de C, H e O na sua composição elementar, ocasionando efeitos negativos sobre a eficácia da ionização (Durden, 2006).

Além disso, as LMs, desprovidas de átomos de nitrogênio, produzem uma abundância de íons adutos de sódios $[M + Na]^+$ sob um ambiente de ionização em electrospray positivo (ESI), isto é, mesmo que ocorra na ausência de um íon de sódio presente na fase móvel. Traços de sódio, proveniente dos extratos de matriz ou do método são suficientes para a formação de íons $[M + Na]^+$, a qual resulta em curvas de calibração não lineares (Stout *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001).

Uma dificuldade adicional trata-se da baixa capacidade de fragmentação dos adutos de sódio na câmara de colisão, presente nos instrumentos de MS/MS. Alguns compostos, como a abamectina, produzem íons filhos de sinal não significativos, quando provenientes do íon precursor $[M + Na]^+$, razão pela qual os autores investigaram formas alternativas de ionizações (Stout *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001).

Para contornar muitos dos problemas citados, uma alternativa é a ESI no modo negativo. Entretanto, este método apresenta menor sensibilidade que o modo positivo. Para atenuar parcialmente este problema, emprega-se um pH elevado na fase móvel, com a adição de trietilamina (TEA). Outra estratégia é a utilização de ionização química à pressão atmosférica ao invés de ESI (Durden, 2006).

A abordagem mais popularmente aceita, atualmente, é a utilização de sais de amônia na fase móvel com detecção baseada na ESI positiva. Esta estratégia permite detectar as avermectinas que não contenham átomos de nitrogênio, através da monitorização de íons adutos de amônia $[M + NH_4]^+$. Tais adutos produzem íons de

produtos significativamente mais intensos do que os íons precursores de $[M + Na]^+$. Infelizmente, os requisitos de elevada força iônica nas fases móveis suprime a intensidade do sinal das LMs que apresentam átomos de azoto. Em adição, foram observados que as LMs que contêm azotos formar íons de amônia $[M + NH_4]^+$ e íons do analito protonado $[M + H]^+$. Deste modo, diversos autores buscaram otimizar o pH e força iônica da fase móvel para criar condições favoráveis para a ionização dos diferentes compostos que abrangem o método analítico. No entanto, a composição da fase móvel sugerida difere significativamente em força iônica e pH entre os vários artigos publicados, tornando mais difícil alcançar baixos níveis de LOD e LOQ para todos os analitos (Shoop *et al.*, 1996; Ali *et al.*, 2000; Stout *et al.*, 2000).

Tratando-se de analitos ionizáveis, o pH da fase móvel deve ser ajustado para assegurar que o composto esteja em uma única forma, geralmente adotando-se para o pH do tampão uma ou duas unidades ao redor do pKa do composto de interesse. A composição e vazão da fase móvel e o modo de eluição são ajustados de forma a otimizar a separação dos componentes e interferentes (Collins *et al.*, 1997).

As fases móveis empregadas, para o modo de ionização positiva, são constituídas por misturas de acetonitrila e/ou metanol, com solução-tampão de sais de amônio acidificada com ácido acético ou fórmico. No modo negativo, a fase móvel empregada é constituída por acetonitrila e/ou metanol e uma fase aquosa que pode conter trietilamina, a fim de elevar o pH e favorecer a ionização do analito (Turnipseed *et al.*, 2005; Rubensam *et al.*, 2011; Nope *et al.*, 2009).

A eluição pode ser isocrática ou por gradiente. A eluição por gradiente é uma técnica frequentemente utilizada a fim de separar os resíduos ou para remover interferentes que eluam tardiamente da coluna, sendo mais utilizada na separação de substâncias complexas com diferentes funções químicas (Collins *et al.*, 1997).

Os métodos existentes na literatura para determinação de MOX (Tabela 6) em diferentes matrizes descrevem, preferencialmente, a utilização de colunas de fase reversa do tipo octadecil (C18) (Noppe *et al.*, 2009; Turnipseed *et al.*, 2005). A C18 é uma fase estacionária de sílica quimicamente ligada ao octadecil. Por ser quimicamente ligada, a coluna apresenta maior estabilidade química e permite a utilização de elevados valores de

vazões e temperaturas. Contudo, apesar da maior estabilidade das colunas, cadeias alquilas de grande densidades também contribuem para o aumento no tempo de retenção dos analitos, em virtude da maior área superficial do suporte e do maior grau de capeamento (Collins *et al.*, 1997).

O procedimento quantitativo por LC-MS/MS tem um problema de que os compostos coextrativos das amostras podem provocar a supressão dos íons e/ou melhora dos analitos, sendo a matriz de calibração de correspondência uma alternativa fiável para compensar os efeitos da matriz na análise das LMs (Ferrer, 2007).

Tabela 6. Métodos para a detecção de lactonas macrocíclicas por LC-MS/MS.

Analito	Matrix	Extração	Clean-up	Rec. (%)	FE e FM	Det.	LOD µg kg ⁻¹	LOQ µg kg ⁻¹	Ref.
EPR, MOX, ABA, DOR, IVE	Músculo e fígado de porco, tecido de peixe e leite	ACN	SPE C-18 e cartucho de alumina	62,4-104,5	ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 µm; 2,1x50mm) 0.1% Ácido formic em água/ ACN (15:85 v/v)	UPLC-ESI-Triplo quadrupolo	0,05-0,68	0,17-2,27	Wang <i>et al</i> 2011
Multiresíduos (IVE, ABA)	Leite e músculo	ACN, Sulfato de amônia, Solução Antioxidante	LLE	Δ	Kinetex Core-Shell, C18 (150 × 2,1 mm; 2,6 µm) (A) ACN/Ác. Formic (B) H2O/ Ác. Formic/ ACN/ Luna C18	HPLC-ESI-Tandem quadrupolo	1,64 IVE 1,38 ABA µg/L (leite)	3,04 IVE 2,1 ABA µg/L (leite)	Kauffman <i>et al</i> 2011
ABA, DOR, EPR, IVE, MOX	Leite bovino	ACN	LLE	112,4-119,3 p/ MOX	(150mm×2.1mm; 5µm) 50 mM Tampão de Acetato de amônio (pH 5): ACN (5:95, v/v) HSS T3	HPLC-ESI-Triplo Quadrupolo	12,5ng/mL	18ng/mL	Rubensam <i>et al</i> 2011
Benzimidazol, avermectina e fluquicidas	Leite	12 mL ACN, MgSO ₄ (4g) e NaCl (1g)	SPE C-18 E LLE	88-98 p/ MOX	(2,1 x 100mm; 1,8µm) 0,01% de AcOH em água:ACN (90:10, v/v) e 5 mM de MeOH:ACN (75:25, v/v)	UPLC-ESI-Triplo Quadru polo	45 p/ MOX CCα	52 p/ MOX CCβ	Whelan <i>et al</i> 2010

Tabela 6. Continuação

Analito	Matrix	Extração	Clean-up	Rec. (%)	FE e FM	Det.	LOD $\mu\text{g kg}^{-1}$	LOQ $\mu\text{g kg}^{-1}$	Ref.
benzimidazol, ivermectina e fluquicidas	Fígado bovino	10 mL ACN, MgSO ₄ (4g) e NaCl (1g)	QuEChERS	119- 123	Acquity HSS T3 C18 (100×2.1mm, 1.8 μm) (A) 0.01% AcOH:ACN (90:10, v/v) (B) 5mM Formato de amônia em MeOH:ACN (75:25, v/v).	UPLC- ESI- Triplo Quadrupolo	107 p/ MOX CC α	118 p/ MOX CC β	Kinsella <i>et al</i> 2009
DOR, ABA, EMA, EPR, IVE, MOX	Fígado de porco, tecido de carne bovina e peixe	8 mL ACN, 25 mL Água e 25 μL TEA	SPE C-18	103 p/ MO	Symmetri C18 (2,1 × 150 mm; 5 μm) (A) 0.05% TEA em Água (B) 0.05% TEA em água	HPLC APCI MS/MS	-	10 p/ MOX CC β	Noppe <i>et al</i> 2009
DOR, ABA, EMA, EPR, IVE, MOX	Fígado, fígado e fígado de ordura bovina	30 mL de acetona/0,5 % amônia em água (50:50 v/v), 5 g de NaCl	LLE Isooctano 20mL de hexano e 20 mL de ACN	93,0- 96,7 p/mo x	TSK-Gel (2,0 × 50 mm; 3 μm) (A) 0,1% de FA e 0.1mM formato de Am em água 0,1% de FA em ACN MeOH/Água (9:1 v/v) e ACN/Água (9:1 v/v) com ác. fórmico 0,1%, e acetato de amônio 5Mm	HPLC – ESI MS/MS	0,8-1,5 p/ MOX	5-10 p/ MOX	Inoue <i>et al</i> 2009
DOR, ABA, EMA, EPR, IVE, MOX, SEL	Solo, sedimento e água		SPE C-18			HPLC – ESI MS/MS	0,02	0,05	Krogh <i>et al</i> 2008

Onde: Rec – Recuperação; FM – Fase móvel; FE – Fase estacionária; DET – Detector; LOD – Limite de detecção; LOD – Limite de quantificação; REF – referência.

Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que permite identificar a composição química de um composto através de suas massas moleculares na forma iônica, ou seja, com carga elétrica líquida, positiva ou negativa, baseada na sua movimentação através de um campo elétrico. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, designada por m/z . Deste modo, conhecendo o valor de m/z de uma molécula é possível inferir sua composição química elementar e determinar sua estrutura (Bramer, 1998).

Dentre as fontes comumente empregadas para a ionização, destaca-se a ionização por eletronebulização (ESI). A ESI é uma técnica branda de ionização à pressão atmosférica, garantindo a eficiência da ionização de 10^3 a 10^4 vezes maior que em pressão reduzida. Este método produz íons de baixa energia e geralmente monocarregados, facilitando a identificação dos compostos, sem a obrigatoriedade do uso de bibliotecas de espectros, além de permitir alta detectabilidade e seletividade em análises rápidas. O surgimento deste tipo de técnica permitiu a análise de quase todos os tipos de moléculas (Hernandez *et al.*, 2005; WC, 2002).

A ESI ocorre quando um solvente volátil, contendo os analitos, é bombeado através de um fino capilar de aço inoxidável. Uma alta tensão é aplicada à ponta deste capilar e, como consequência do forte campo elétrico, o solvente torna-se eletricamente condutivo. Na saída do capilar, conforme o campo elétrico aumenta, as microgotas do solvente sofrem deformação em sua superfície, originando o chamado Cone de Taylor. Quando o forte campo elétrico gerado excede a tensão superficial do solvente, as gotas são lançadas na forma de um jato, formando um spray. Deste modo, a amostra que flui do capilar estará dispersa em um eerosol composto por minúsculas gotículas de solvente e analito altamente carregadas. Geralmente, compostos com menos de 1000 Da produzem íons protonados com carga única no modo positivo ($[M+H]^+$) ou no modo negativo ($[M-H]^-$) de ionização, dependendo da estrutura do composto. Fluindo externamente ao capilar, um gás de nebulização (geralmente o nitrogênio), com elevada temperatura (150-200 °C), irá auxiliar

na rápida evaporação do excesso de solvente, conforme esquematizado na Figura 10 (Yamashita e Fenn, 1984).

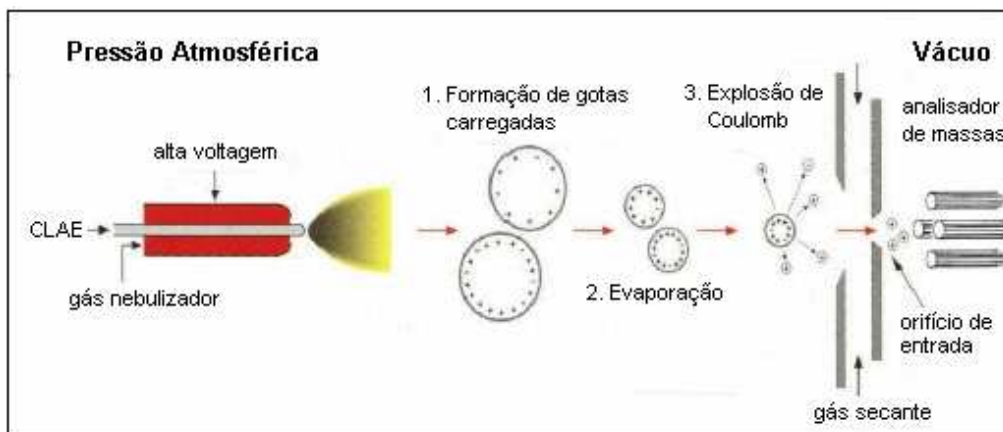


Figura 10. Modelo de ionização por eletronebulização.

Fonte. Applied Biosystems, 2012.

À medida que o solvente é evaporado, as cargas ali contidas passam a ter maior proximidade e, consequentemente, maior repulsão eletrostática. Quando a densidade de cargas for suficientemente elevada para superar a tensão superficial do solvente, ocorrerá um colapso na microgota e, subsequentemente, ejeção dos analitos carregados, em um processo conhecido como explosão de Coulomb (Yamashita e Fenn, 1984).

Por trabalhar com moléculas em solução e ser compatível com os solventes frequentemente usados em LC por fase reversa (metanol, água e acetonitrila), a ESI pode ser usada como interface entre separações por LC e identificação dos compostos por espectrometria de massa simples (MS) ou em tandem (MS/MS) (WC, 2002).

Em relação aos analisadores de massas, os métodos que empregam EM são particularmente adequados para confirmação de identidade do composto de interesse, através de medidas das massas exatas do íon precursor e de seus produtos de fragmentação, fornecendo informações sobre a estrutura química da molécula. O triplo quadrupolo, analisador de massas utilizado no presente estudo, apresenta um desempenho incomparável na quantificação no que diz respeito à faixa dinâmica, à repetibilidade e à sensibilidade (Eberlin, 2009).

Este espectrômetro de massa é composto por um primeiro quadrupolo (Q1), uma cela de colisão (Q2) e o terceiro quadrupolo (Q3), conforme apresentado na Figura 11a, podendo ser operado de diferentes modos com dissociação induzida por colisão. Um quadrupolo consiste em quatro eletrodos metálicos em paralelo (Figura 11b). Seu mecanismo de funcionamento se dá através da aplicação de uma corrente elétrica específica em cada uma delas e da imposição de uma radiofrequência, que criam um campo elétrico capaz de estabelecer uma trajetória para íons com razão massa/carga (m/z) específica, funcionando então como um “filtro de massa”. Quando apenas um quadrupolo é utilizado para análise, a capacidade de confirmação do analito torna-se limitada, devido à baixa exatidão da massa lida. Deste modo, o equipamento não será capaz de separar compostos com razões de massas/carga (m/z) semelhantes, fato que pode ser solucionado adicionando outros analisadores de massa em sequência, como o exemplo do triplo quadrupolo (Hoffmann e Stroobant, 2007; Dass, 2007).

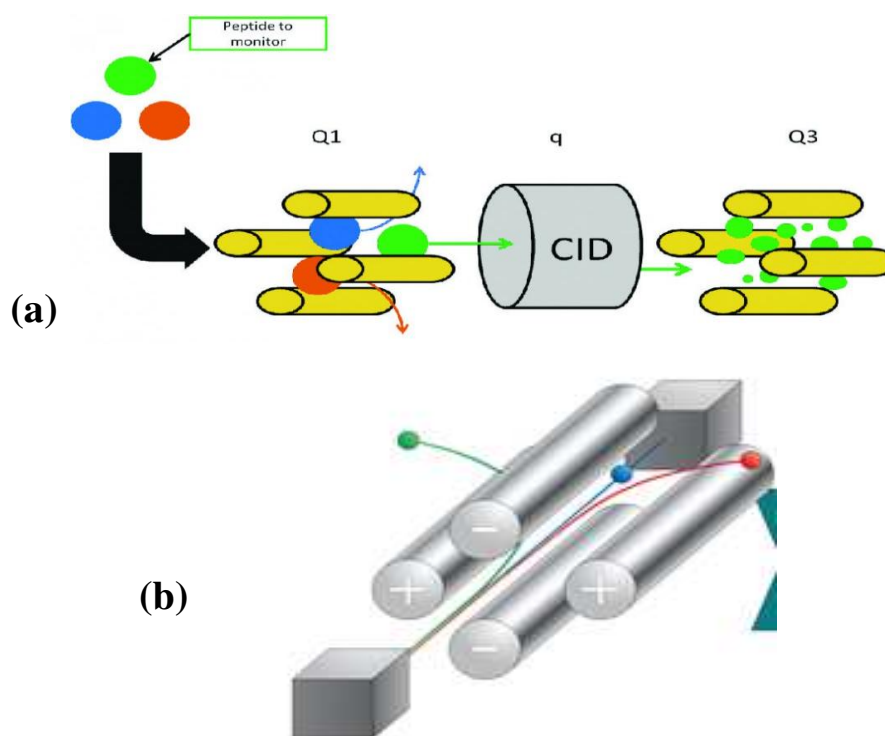


Figura 11. Esquema de um equipamento do tipo (a) triplo quadrupolo e (b) quadrupolo.

Fonte. Broad Institute, 2012.

O modo empregado no presente trabalho foi pelo Monitoramento de Reação Múltipla (MRM), o qual permite quantificar compostos presentes na amostra de identidade conhecida, bem como a de seus precursores e os íons a serem formados. As câmaras de Q1 e Q3 são ajustadas para determinação de uma massa específica, onde Q1 detecta o íon principal e Q3, o fragmento. A associação do composto é chamada de “par”. Portanto, pode-se dizer que Q1 e Q3 realizam a varredura para detecção dos “pares” desejados (Sparkman, 2006; Eberlin, 2009).

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA

A validação do método é de extrema importância para garantir que o procedimento analítico desenvolvido gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, diminuindo ou controlando os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado. As características a serem estudadas e o método a aplicar variam em função do tipo de procedimento a validar. Os parâmetros mais importantes para validação do método analítico, em geral, são: linearidade, seletividade, efeito matriz, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (Tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros analíticos da validação.

PARÂMETRO	DEFINIÇÃO	REFERÊNCIA
LINEARIDADE	Mede a capacidade que tem o método para demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.	MAPA (2011)
SELETIVIDADE	Mede a capacidade que tem o método para identificar e/ou quantificar o analito, apesar da presença de possíveis interferentes (impurezas, metabólitos e outros).	IUPAC (2002)
EFEITO MATRIZ	É um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas por elementos diversos que compõem a matriz amostral gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal de emissão.	MAPA (2011)
PRECISÃO	Mede o grau de concordância de resultados de testes independentes obtidos sob condições estabelecidas.	IUPAC (2002)
LIMITE DE DETECÇÃO (*)	É definida como a menor quantidade do analito na amostra que pode ser diferenciada, de forma confiável, do ruído de fundo.	ANVISA (2003)
LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (*)	É definida como a menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas.	ANVISA (2003)
EXATIDÃO	Mede a proximidade dos resultados obtidos pelo método desenvolvido em relação ao valor verdadeiro, utilizando um procedimento experimental para uma só amostra por repetidas vezes.	IUPAC (2002)
Limite de decisão (CC_{α} **)	Definido como o menor nível de concentração no qual o método pode discriminar com uma certeza estatística de $1-\alpha$ que o analito em questão está presente.	MAPA (2011)
Capacidade de detecção (CC_{β} **)	Representa a menor quantidade da substância que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada em uma amostra com uma probabilidade de erro aceitável (β).	MAPA (2011)

(*) Parâmetros não considerados pelo MAPA.

(**) Estabelecidos para fins de fiscalização

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ovinocultura vem despertando enorme interesse em todas as regiões do Brasil em virtude da alta demanda pela produção de carne. Em função da importância de se manter a produção constante e com boa qualidade do produto, e devido aos modelos produtivos na ovinocultura basearem-se em sistemas de produção em pastagens, onde os animais podem ser frequentemente infectados por parasitas gastrointestinais, a utilização de antiparasitários tem sido largamente empregada.

Com o uso indiscriminado e abusivo dos medicamentos antihelmínticos destacam-se duas problemáticas: o desenvolvimento de resistência dos parasitas à ação dos antihelmínticos e a presença de resíduos destes compostos no produto final.

Como medida de controle da resistência dos parasitas aos medicamentos existentes no mercado, e também visando minimizar a proliferação de enfermidades entre os animais, algumas alternativas de manejo e produção vêm sendo estudadas, entre as quais pode-se citar: o manejo dos rebanhos e da pastagem, adequada nutrição em função das diferentes categorias, seleção de animais resistentes, o controle biológico, a utilização de vacinas, a fitoterapia e/ou a utilização de técnicas para avaliação do grau de infecção dos animais, de forma a garantir que os procedimentos de controle sejam efetivos (tratamento seletivo).

Dentre as técnicas para avaliação do grau de carga parasitária dos ovinos destacam-se o exame do grau FAMACHA® e a contagem de ovos por grama de fezes (OPG). O método FAMACHA® trabalha com a premissa de apenas tratar os animais altamente parasitados, identificando aqueles capazes de suportar uma infecção por *H. contortus*, por meio da coloração da membrana conjuntiva. A contagem de OPG busca administrar o fármaco para os animais que possuem alta contagem de ovos presentes nas fezes. Outra alternativa que tem sido empregada na prática, por muito tempo, é administrar o fármaco em tempos regulares, afim de inibir infecções clínicas e/ou subclínicas, o que leva inclusive à aplicação do medicamento em animais que não estão parasitados, aumentando o custo com o tratamento e podendo ocasionar a resistência parasitária.

O estudo farmacocinético fornece informações indispensáveis para uma maior segurança sobre a utilização dos produtos veterinários nos sistemas de produção, obtendo-

se assim, as melhores taxas de erradicação parasitária com os menores níveis de resistência. Para tanto, é importante salientar a necessidade do desenvolvimento e validação de métodos analíticos, que possibilitem esses estudos. O emprego da técnica por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas apresenta vantagens como a seletividade e a possibilidade de confirmação da identidade dos analitos, aumentando, assim, a confiabilidade dos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, M.S.; Sun, T.; Mcleory, G. E.; Phillippo, E. T. J. 2000. Confirmation of eprinomectin, moxidectin, abamectin, doramectin, and ivermectin in beef liver by liquid chromatography/positive ion atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *AOAC International* 83 (1): 39-52.
- Alvinerie, M., E. Escudero, J.F. Sutra, C. Eeckhoutte P. A. 1998. The pharmacokinetics of moxidectin after oral and subcutaneous administration to sheep. *Veterinary Research* 157 (1-2): 117–122.
- Amarante, A. F. T.; Bricarello, P. A.; Rocha, R. A.; Gennari, S. M. 2004. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Veterinary Parasitology* 120 (1-2): 91–106.
- Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F J. 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 86 (2): 412-431.
- Antonić, J.; Grabnarb, I.; Cinski, L. M.; Skibina, A.; Süssingera, A.; Cnika, M. P.; Cerkenik-Flajsa, V. 2011. Influence of P-glycoprotein inhibition on secretion of ivermectin and doramectin by milk in lactating sheep. *Veterinary Parasitology* 179 (1-3): 159–166.
- ANVISA. 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29/05/2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899.03re.htm>. Acessada em: 26/07/2012
- Applied Biosystem. 2012. Disponível em: www.appliedbiosystems.com.br. Acesso em: 02/02/2012.
- Arosemena, N. A. E.; Bevilaqua, C. M. L.; Melo, A. C. F. L.; Girão, M. D. 1999. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid areas in Brazil. *Revue Médecine Vétérinaire* 150 (11): 873-876.
- Ayres, M. C. C.; Almeida, M. A O. 1996. Agentes antinematódeos. p. 453-465. In: Spinosa, H. S., Gorniak, S. L.; Bernardi, M. M. *Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

- Ballent, M.; Lifschitz, A.; Virkel, G.; Sallovitz, J.; Maé, L.; Lanusse, C. 2011. In vivo and ex vivo assessment of the interaction between ivermectin and danofloxacin in sheep. *The Veterinary Journal* 192 (3): 422-427.
- Barrionuevo, W. R.; Lanças, F. M. 2001. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. *Química Nova* 24 (2): 172-175.
- Bath G.F., Van Wyk, J.A. 2001. Using the Famacha system on commercial sheep farms in South Africa. *Anais International Sheep Veterinary Congress, Cape Town, South Africa*, 1: 3.
- Bradley, J. M.; Parks, V. Chalon, S.; Gourley, I.; Matschke, K.; Cailleus, K.; Fitoussi, S.; Fleckenstein, L. 2012. The Effect of a High-Fat Breakfast on the Pharmacokinetics of Moxidectin in Healthy Male Subjects: A Randomized Phase I Trial. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86(1): 122–125.
- Braga, R. M.; Girardi, J. L. 1991. População de larvas de helmintos infestantes de ovinos em pastagem nativa de Roraima. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 26 (4): 569-574.
- Bramer, S. E. 1998. An introduction to mass spectrometry. Widener University, Chester PA.
- Broad Instituct. 2012. Mass Spectrometry at the Broad Institute. Disponível em: <http://www.broadinstitute.org>. Acessado em: 02/12/2012
- Caldas, S. S.; Gonçalves, F. F.; Primel, E. G.; Prestes, O. D.; Martins, M. L.; Zanella, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova* 2011, 34 (9), 1604-1617
- Calfat, J. Cordeiro de corte: um mercado inexplorado. 2012. Disponível em: <http://www.cordeirobrasileiro.com.br/boletim5.htm>. Acessado em: 07/05/12.
- Chagas, A. C. S.; Oliveira, M. C. S.; Carvalho, C. O.; Molento, M. B. 2007. Método Famacha: Um recurso para o controle da verminose em ovinos. *Circular Técnica. Embrapa Pecuária Sudeste. São Carlos-SP*.
- Chagas, A.C. S. 2009. Resíduos de anti-helmínticos no leite de caprinos. In: Cavalcante, A.C.R.; Vieira, L. da S. et al. *Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 603.
- Ciolla, R. 1998. *Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho*. ed. Edgard Blücher Ltda., São Paulo.
- Collins, C.H; Braga, G.L; Bonato, P.S. 1997. *Introdução a Métodos cromatográficos*. 7.ed. Campinas: Unicamp, p.13-16;185-223.
- Danaher, M.; Howells, L. C.; Crooks, S. R. H.; Cervenik-Flajs, V. C.; O'keeffe, M. 2006. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B* 844 (2): 175–203.
- Danaher, M.; O'keeffe, M.; Glennon, J.D. 2000. Validation and robustness testing of a HPLC method for the determination of avermectins and moxidectin in animal liver samples using an alumina column clean-up. *Analyst* 125 (10): 1741-1744.
- Dass, C. 2007. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.

- Death, C. E.; Taggart, D. A.; Williams, D. B.; Milne, R.; Schultz, D. J.; Holypake, C.; Warren, K. S. 2011. Pharmacokinetics of moxidectin in the southern hairy-nosed wombat (*lasiorhinus latifrons*). *Journal of Wildlife Diseases* 47(3): 643–649.
- Dupuy, J.; Larrieu, J. F. Sutra; Lespine, A.; Alvierie, M. 2003. Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. *Veterinary Parasitology* 112 (4): 337–347.
- Durden, D. A. 2006. Positive and negative electrospray LC–MS–MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. *Journal of Chromatography B* 850 (1-2): 134–146.
- Eberlin, M. N. 2009. Espectrometria de massas: princípios e aplicações: <http://www.espectrometriademassas.com.br>. Acesso em: 02/2012.
- Entrocasso D, D Parra, D Vottero, M Farías, LF Uribe, WG Ryan. 1996. Comparison of the persistent activity of ivermectin, abamectin, doramectin and moxidectin in cattle. *Veterinary Record* 138 (4): 91-92.
- Eraslan, G.; Kanbur, M.; Liman, B. C.; Cam, Y.; Karabacak, M.; Altinordulu, S. 2010. Comparative pharmacokinetics of some injectable preparations containing ivermectin in dogs. *Food and Chemical Toxicology* 48 (8-9): 2181–2185.
- FAO. 2009. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Estatísticas FAO. Disponível em: <www.fao.org>. Acessado em 04/03/2012
- Farer, L. J.; Hayes, J.; Rosen, J. Knight, P. 1999. Determination of emamectin benzoate in medicated fish feed. *AOAC International* 82 (6) 1281-1297.
- FDA. 1997. Food and Drug Administration. Enviromental Assessment: Cydectin moxidectin 0.5% Pour-On for Cattle. Published by the Center for Veterinary Medicine. Disponível em:<http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-av-gen/documents/document/ucm072383>. Acesso em: 04/02/2012
- FDA. 1998. Food and Drug Administration. Freedom of information summary. NADA nº 141-099. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/ucm117588.pdf>. Acesso em: 04/03/2012
- Ferrer, I.; Thurman, E. M.; Zweigenbaum, J. A. 2007. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 21 (23): 3869–3882.
- Frimodt-Moller, N. 2002. How predictive is PK/PD for antibacterial agents? *International Journal of Antimicrobial Agents* 19 (4): 333-339.
- Gokbulut, C.; Bilgili, A.; Hanedan, B.; Aksit, D.; Aksoy, A. M.; Turgut, C. 2009. Breed-related plasma disposition of ivermectin following subcutaneous administration in Kilis and Damascus goats. *Research in Veterinary Science* 87 (3): 445–448.
- Gokbulut, C.; Cirak, V. Y.; Senlik, B.; Aksit, D.; Durmaz, M.; McKellar, Q. A. 2010. Comparative plasma disposition, bioavailability and efficacy of ivermectin following oral and pour-on administrations in horses. *Veterinary Parasitology* 170 (1-2): 120–126.
- Hepworth, K.; Neary, M.; Hutchens, T. 2006. Managing Internal Parasitism in Sheep and Goats. Purdue University Cooperative Extension Service, West Lafayette.

- Hernandez, F.; Sancho, J. V.; Pozo, O. J. 2005. Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382 (4): 934-946.
- Hoffmann, E.; Stroobant V. 2007. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons, Chichester, UK. Third Edition.
- IBGE. 2010. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Sistema IBGE de Recuperação Automática. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acessado em 27/03/2012
- Inoue, K.; Yoshimi, Y.; Hino, T.; Oka, H. 2009. Simultaneous determination of avermectins in bovine tissues by LC-MS/MS. *Journal of Separation Science* 32 (21): 3596–3602.
- IUPAC. 2002. União Internacional de Química Pura e Aplicada: Compendium of Chemical Terminology – Gold Book. Disponível em: < <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf> >. Acessada em: 27/06/2012.
- Kaplan, R.; Burke, J.M.; Terrill, T.H.; Miller, J.E.; Getz, W.R.; Mobini, S.; Valencia, E.; Williams, M.J.; Williamson, L.H.; Larsen, M.; Vatta, A. 2004. Validation of the FAMACHA® eye colour chart for detecting clinical anaemia in sheep and goats on farms in the southern United States. *Veterinary Parasitology* 123: 105-120.
- Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K.; Walker, S.; Widmer, M. 2011. Quantification of anthelmintic drug residues in milk and muscle tissues by liquid chromatography coupled to Orbitrap and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta* 85 (2): 991– 1000.
- Kinsella, B.; Whelan, M.; Cantwell, H.; McCormack, M.; Furey, A.; Lehotay, S. J.; Danaher, M. 2009. A dual validation approach to detect anthelmintic residues in bovine liver over an extended concentration range. *Talanta* 637 (1-2): 196–207.
- Krogh, K. A.; Bjorklund, E.; Loefflern, D.; Fink, G.; Halling-Sorensen, G.; Ternes, T.A. 2008. Development of an analytical method to determine avermectins in water, sediments and soils using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1211 (1-2): 60–69.
- Krychak-Furtado, S. 2006. Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes in vitro e in vivo. Tese de Doutorado em Agronomia. Departamento de fitotecnia e fitossanitarismo. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Lanusse, C. E. 1996. Farmacologia dos compostos antihelmínticos. p.1-44. In: Controle dos nematódeos gastrintestinais. Terezinha Padilha.
- Lanusse, C.E.; Ballent, M.; Lifschitz, A. 2008. Modulation of cellular drug efflux: impact on antiparasitic therapy. In: XV Congresso brasileiro de parasitologia veterinária e ii segundo seminário de parasitologia veterinária dos países do mercosul, 15, Curitiba. Anais.Paraná: CBPV. 1CD-ROM.
- Lifschitz, A.; Virkel, G.; Ballent, M. Sallovitz, J. Lanusse, C. 2009. Combined use of ivermectin and triclabendazole in sheep: In vitro and in vivo characterisation of their pharmacological interaction. *The Veterinary Journal* 182 (2): 261–268.
- Lifschitz, A.; Virkel, G.; Imperiale, F.; Pis, A.; Lanusse, C. 2002. Fármacos endectocidas: avermectinas y milbemicinas. En: Botana LM, Landoni F, Matín-Jiménez T (eds).

- Farmacología y Terapéutica Veterinaria. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, España 545-558.
- Lifschitz, A.; Virkel, G.; Pis, A.; Imperiale, F.; Sánchez, S.; Alvarez, L.; Kuyanek R.; Lanusse, C. 1999. Ivermectin disposition kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil-based formulation to cattle. *Veterinary Parasitology* 86 (3): 203-215.
- Maddison, J.E.; Page, S.W.; Church, D.B. 2010. *Farmacologia clínica de pequenos animais*. 2 ed. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=JXg-Dc8CHboC&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 11/03/2012.
- MAPA. 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 24. Anexo II: Guia para Validação de Métodos Analíticos e Controle de Qualidade Interna das Análises de Monitoramento do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC. Diário Oficial, nº 138, jul. 2011.
- McManus, C.; Louvandini, H.; Verdolim, V.; Torres, S.; Brito, D.; Melo, C.B.; Seixas, L. 2011. Determinação de endoparasitas na pastagem e os animais. Disponível em: http://animal.unb.br/imagens/Serie_tecnica_endoparasitas_ovinos.pdf. Acesso em 20 de dezembro de 2011.
- Molento M.B. 2005. Avanços no diagnóstico e controle das helmintoses em caprinos. p. 101-110. I Simpósio Paulista de Caprinocultura (SIMPAC). Multipress, Jaboticabal.
- Molento, M.B. 2009. Resistência Parasitária. p. 603. In: Cavalcante, A.C.R.; Vieira, L. da S. et al. Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica.
- Molento, M. B.; Severo, D. 2004. *Famacha*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. Folheto técnico.
- Moreira; J. N. ; Correia, R. C.; Araújo, J. R. de; Silva, R. R. 1997. Estudo do Circuito de Comercialização de Carnes de Caprinos e Ovinos no Eixo Petrolina-PE/Juazeiro-BA. p. 22. Petrolina (PE). EMBRAPA-CPATSA.
- Niessen, W. M. A. 2006. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. 3. ed. Leiden: Taylor e Francis.
- Noppe, H.; Verheyden, K.; Bussche, J. V.; Wille, K.; Brabander, H. 2009. Detection of macrocyclic lactones in porcine liver, meat and fish tissue using LC–APCI–MS–MS. *Food Additives and Contaminants* 26 (9): 1232-1238.
- Perez, R.; Godoy, C.; Palma, C.; Munoz, L.; Arboix, M.; Alvinerie, M. 2010. Plasma disposition and fecal elimination of doramectin after oral or intramuscular administration in horses. *Veterinary Parasitology* 170 (1-2): 112–119.
- Prichard, R.K. 2007. Ivermectin resistance and overview of the Consortium for Anthelmintic Resistance SNPs. *Expert Opin. Drug Discov* 2 (1), 41-52.
- Ramos, C. I. ; Bellato, V.; Souza, A. P.; Ávila, V. S.; Coutinho, G. C.; Dalagnoll, C. A. 2004. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. *Ciência Rural* 34 (6) 1889-1895.
- Rubensam, G. 2010. Determinação dos resíduos de avermectinas e milbemicinas em leite bovino por cromatografia líquida e detecção por fluorescência e espectrometria de massas. Dissertação de mestrado em Biologia celular e molecular. Universidade federal do Rio Grande do Sul.

- Rubensam, G.; Barreto, F.; Hoff, R.B.; Kista, T.L.; Pizzolato, T. M. 2011. A liquid–liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 705 (1-2): 24–29.
- Rupp, H.S.; Turnipssed, C.C.; Walker, J.E.; Roybal, A.R.; Long, J. 1998. Determination of ivermectin in salmon muscle tissue by liquid chromatography with fluorescence detection. *AOAC International* 81 (3): 549–553.
- Shoop, W. L.; Mrozik, H.; Fisher, M. 1996. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology* 59 (2): 139-156.
- Silva, W. W.; Bevilaqua, C. M. L.; Rodrigues, M. L. A. 2003. Variação sazonal de nematoides gastrintestinais em caprinos traçadores no Semi-árido Paraibano-Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 12 (2): 71-75.
- Sotomaior, C.S.; Carli, L.M.; Tangleica, L.; Kaiber, B.K.; Souza, F.P.; 2007. Identificação de ovinos e caprinos resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais. *Revista Acadêmica* 5 (4): 397-412.
- Sparkman, O. D. 2006. Em: *Mass spectrometry desk reference*. p. 98. Global View Publishing. Pittsburgh.
- Spinosa, H.S. 1995. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. p. 460. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Stout, S. J.; Wickremesinhe, E.; Cunha, A.R.; Khunachak, A. 2000. Confirmation of moxidectin residues in cattle fat by liquid chromatography. *AOAC International* 83 (6): 1446-1454.
- Sumano L.H.; Ocampo, C.L. 2006. *Farmacología Veterinaria*. p. 481-482. 3 ed. MacGraw-Hill Interamericana, México D.F., México.
- Turnipssed, S. B.; Roybal, J. E.; Andersen, W. C.; Kuck, L. R. 2005. Analysis of avermectin and moxidectin residues in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using an atmospheric pressure chemical ionization/atmospheric pressure photoionization source. *Analytica Chimica Acta* 529 (1-2): 159–165.
- Urquhart, G. M.; Armour, J.; Duncan, J. L.; Dunn, A. M.; Jennings, F. W. 1998. Ancilóstomos de cães e gatos. *Parasitologia Veterinária*. p. 292. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan.
- Van Wyk, J. A.; Bath, G. F. 2002. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research* 33 (5): 509-529.
- Viana, J. G. A. 2008. Panorama geral da ovinocultura no Mundo e no Brasil. *Revista Ovinos*, Porto Alegre 4 (12): 1-9.
- Viegas, A. 2012. Consumo per capita de carne ovina no Brasil é de apenas 400 gramas por ano. Disponível em: http://www.agrodebate.com.br/_conteudo/2012/06/noticias/2949-consumo-per-capita-de-carne-ovina-no-brasil-e-de-apenas-400-gramas-por-ano.html. Acessado em: 28/06/2012
- Vieira, L. S. 2003. Alternativas de controle da verminose gastrintestinal dos pequenos ruminantes. Sobral. Documentos, 29. EMBRAPA-CNPIC.
- Wang, F.; Chen, J.; Cheng, H.; Tang, Z.; Zhang, G.; Niu, Z.; Pang, S.; Wang, X.; Lee, S. C. 2011. Multi-residue method for the confirmation of four avermectin residues in food products of animal origin by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass

- spectrometry. *Food Additives and Contaminants* 28 (5): 627–639.
- WC. 2002. Waters Corporation, Micromass. Em: Q-ToF micro Mass Spectrometer Operator's Guide, Milford.
- Whelan, M.; Kinsella, B.; Furey, A.; Moloney, M.; Cantwell, H.; Lehotay, S. J.; Danaher, M. 2010. Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. *Journal of Chromatography A* 1217: 4612–4622.
- WHO. 2004. World Health Organization. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series n° 53. Geneva.
- Wu, Z.; Li, J.; Zhu, L.; Luo, H.; Xu, X. 2001. Multi-residue analysis of avermectins in swine liver by immunoaffinity extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal Chromatography B Biomedical Sciences Applications* 755 (1): 361-366.
- Xu, M.; Molento, M.; Blackhall, W.J.; Ribeiro, P.; Beech, R.; Prichard, R.K. 1998. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Molecular and Biochemical Parasitology* 91 (2): 327-335.
- Yamashita, M.; Fenn, J. B. 1984. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *Journal of Physical Chemistry* 88 (20): 4451-4459.

CAPÍTULO II

MOXIDECTINA NO SORO DE CORDEIROS: PERFIL FARMACOCINÉTICO E AVALIAÇÃO DE SEUS RESÍDUOS EM DIFERENTES MÉTODOS DE CONTROLE PARASITÁRIO

Artigo a ser submetido para publicação na revista Journal of the Brazilian Chemical Society

RESUMO

A produção de ovinos destina-se principalmente a criação de cordeiros para a produção de carne. O tratamento das parasitoses, principal impasse nos sistemas de produção especialmente em pastagens, é realizado com medicamentos veterinários com ação contra endo e ectoparasitas. A moxidectina (MOX) é um anti-helmíntico que vem sendo largamente empregado na ovinocultura devido ao seu longo tempo de ação em baixas doses. Deste modo, no presente estudo foi desenvolvido e validado um método simples e rápido para quantificação e confirmação da MOX por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS), a fim de avaliar o perfil farmacocinético da MOX no soro de cordeiros, bem como verificar o efeito de três métodos de controle de endoparasitas sobre a presença de resíduos de MOX no soro no momento do abate. O preparo da amostra foi baseado na extração com acetonitrila, limpeza do extrato por fase sólida dispersiva utilizando amina primária e secundária (PSA), e a determinação realizada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série (LC-ESI-MS/MS). O método analítico desenvolvido foi validado apresentando exatidão entre 80-107,3 % e valores de precisão intra e interdias entre 1,7-6,7 %. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) determinados foram de 2,0 ng mL⁻¹ e 5,0 ng mL⁻¹, respectivamente. Os resultados dos parâmetros de validação demonstraram que o método foi adequado para determinar a presença da MOX no soro de cordeiro. A disposição da MOX no soro foi avaliada em cordeiros da raça suffolk (n=7), após administração subcutânea de 0,2 mg kg⁻¹ de peso corpóreo, em uma única dose. As concentrações de MOX no soro apresentaram valores de C_{máx} 8,5 ± 2,81 ng mL⁻¹, no T_{máx} de 1 dia. O valor da AUC foi de 82,42 ± 8,02 ng dia.mL⁻¹. O T_{1/2} obtido foi de 7,66 ± 1,62 dias. Os resultados indicam uma absorção subcutânea lenta e, portanto, maior exposição sistêmica e menor disponibilidade do fármaco na circulação sanguínea, quando comparado com outras espécies como caprinos, bovinos ou com outros fármacos como a ivermectina. Para avaliação dos tratamentos antiparasitários em condições de criação no campo, foram selecionados 40 cordeiros sendo o fármaco aplicado (aplicação subcutânea de 0,2 mg Kg⁻¹ de peso corpóreo) de forma preventiva (a cada 28 dias) ou sempre que o animal apresentasse necessidade de aplicação conforme o tratamento avaliado (após contagem de ovos por grama de fezes (OPG) ou

FAMACHA). Na época do abate não foi verificada a presença de MOX no soro dos animais, em níveis acima do LOQ.

Palavras-chave: cordeiros, moxidectina, validação, farmacocinética.

ABSTRACT

In Brazil, the sheep breeding is primarily intended to the production of lamb meat. The treatment of gastrointestinal parasitosis, one of the main impediments in the production systems, is conducted with veterinary drugs with action against endo and ecto-parasites. Moxidectin (MOX) is a paraciticide that has widely been used in the sheep breeding due to its effectiveness at low doses. Thus, in the present study it was developed and validated an analytical method employing liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) for the determination of MOX in the serum, evaluated the pharmacokinetic profile of MOX in suffolk lambs (n=7), and compared the MOX residue levels on the serum of animals (n=40) subjected to three different parasitocidal methods of control in conditions of commercial breeding in the field: faecal egg count of parasites, the FAMACHA® test and the application of MOX at regular periods of 28 days. MOX was always applied by subcutaneous administration of 0.2 mg kg⁻¹ body weight. The developed and validated method was based on acetonitrile extraction, extract cleanup by dispersive solid phase using primary and secondary amine (PSA) plus octadecyl (C18), and analysis by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). The method presented between 80 to 107.3 % accuracy, and precision values between 1.7 - 6.7 %. The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were 2.0 ng mL⁻¹ and 5.0 ng mL⁻¹, respectively. The results of the validation parameters showed that the method was suitable to determine the presence of MOX in the lamb serum. The pharmacokinetic study showed C_{max} value of 8.5 ± 2.81 ng mL⁻¹, and T_{max} of 1 day. The AUC_{0-∞} and the T_{1/2} were 82.42 ± 8.02 ng day.mL⁻¹ and 7.66 ± 1.62 days, respectively. The results indicated a slow MOX subcutaneous absorption and, therefore, increased systemic exposure time and low availability of the drug in blood circulation, when compared to other species such as goats or cattle, or to ivermectin. None of the different parasitocidal control methods evaluated showed MOX residue levels above the LOQ of the analytical method.

Keywords: lambs, moxidectin, validation, pharmacokinetics.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a ovinocultura é uma atividade em desenvolvimento, com investimentos crescentes na atividade e nas estratégias de comercialização. Estas e outras ações, relativas à cadeia produtiva, culminaram no crescimento do número de estabelecimentos rurais com a presença de ovinos, inclusive para locais onde antes a ovinocultura era insignificante (Viana, 2008).

A ovinocultura está baseada, em várias regiões do Brasil, em sistemas de criação em pastagens caracterizada por altas lotações e, conseqüentemente, possibilitando elevada e frequente contaminação larval e infecção parasitária. As infecções por nematódeos gastrintestinais têm se constituído importante entrave à expansão da ovinocultura de corte. A carga parasitária gastrointestinal está associada com mudanças fisiológicas verificadas nos animais, tais como disfunção intestinal e estresse nutricional levando a diminuição na condição corporal, diminuindo o ganho de peso e podendo levar a morte de animais. Dentre os parasitas mais importantes que acometem os rebanhos de ovinos destaca-se o *Haemonchus contortus* (Viana, 2008).

Dentre os antiparasitários de uso permitido para controle de endo e ectoparasitas em ovinos em todo o mundo, as lactonas macrocíclicas tem sido amplamente empregadas devido a sua elevada eficiência em baixas doses (Molento, 2009). A MOX, derivado semi-sintético da nemadectina, é uma lactona macrocíclica proveniente da fermentação de fungos do gênero *Streptomyces cyanogriseus*. Essa lactona vem ganhando destaque nos rebanhos ovinos do Brasil na última década, devido sua eficácia contra nematoides resistentes à ivermectina e outras drogas antiparasitárias, como o benzimidazol. (Sumano e Ocampo, 2006; Lifschitz *et al.*, 2002; Durden, 2006).

Contudo, o uso indiscriminado da MOX tem induzido também a resistência parasitária, assim como ocorreu com outros fármacos no decorrer de sua utilização, podendo tornar o fármaco ineficaz em curto intervalo de tempo (Molento, 2009; Chagas, 2009). Como medida de controle da resistência parasitária, alternativas vem sendo estudadas, também visando minimizar a proliferação de doenças nos animais e o prejuízo às criações, entre as quais podem ser citadas: manejo dos rebanhos e da pastagem, adequada nutrição de acordo com as categorias dos animais do rebanho, seleção de animais

resistentes, controle biológico, utilização de vacinas, fitoterapia e/ou a utilização de técnicas para avaliação do grau de infecção (Molento, 2005).

Dentre os métodos diagnósticos que avaliam a carga parasitária dos ovinos, pode-se destacar: o exame do grau FAMACHA® e a contagem de ovos por gramas de fezes (OPG). O FAMACHA® detecta os animais resistentes ao *H. Contortus*, determinando o grau de anemia do animal através coloração da mucosa conjuntiva. O exame de OPG corresponde a contagem de ovos por gramas de fezes, sendo que o fármaco é administrado quando o animal apresenta uma contagem superior a 700 ovos/g fezes. Outra alternativa é a administração do medicamento em períodos regulares, a fim de se evitar infecções clínicas e subclínicas (Sotomaior *et al.*, 2007; Molento e Severo, 2004). Nesse caso, mesmo sem o resultado de um exame diagnóstico, utilizam-se os fármacos, o que pode acentuar a resistência parasitária, resultado inadequado no momento.

Métodos cromatográficos para determinação de MOX no soro de diferentes espécies (suínos, bovinos, marsupiais, ovinos) têm sido relatados, tais como: a cromatografia líquida com detecção por fluorescência (LC-FL) (Bradley *et al.*, 2012; Gianetti *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2010), ou associada à espectrometria de massas (Stout *et al.*, 2000; Death *et al.* 2011; Wang *et al.* 2011; Rubensam *et al.*, 2011; Noppe *et al.*, 2009; Inoue *et al.*, 2009). No entanto, cabe destacar que os métodos que utilizam a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas são os de escolha devido à possibilidade de confirmação e quantificação dos compostos de interesse.

A maioria dos procedimentos de preparação de amostra relatados para a determinação da MOX no soro envolvem etapas de limpeza utilizando colunas de micro extração em fase sólida (SPM) (Gokbulut *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2010; Cittrackarn *et al.*, 2009; Lifschitz *et al.*, 2009). Esses métodos são demorados, requerem grandes quantidades de solventes orgânicos, resultando no aumento do tempo de análise e do custo (Caldas *et al.*, 2011).

Conforme documentado na literatura, os parâmetros farmacocinéticos de um fármaco veterinário variam conforme a dose administrada, a espécie, o tipo de animal, o local de aplicação, entre outros (Lanusse *et al.*, 1997; Dupuy *et al.*, 2001). Assim, tendo por base os sistemas de criação de ovinos no país, o objetivo deste trabalho foi avaliar a

disposição da MOX no soro de cordeiros, através da determinação dos seguintes parâmetros farmacocinéticos: concentração máxima ($C_{m\acute{a}x}$), temperatura máxima ($T_{m\acute{a}x}$), área em baixo da curva (AUC) e tempo de meia vida ($T_{1/2}$). Foi também quantificado o resíduo da MOX no soro de cordeiros submetidos a três métodos de controle parasitários em condições de campo. Para tanto, foi desenvolvido e validado um método analítico simples e rápido, baseado na extração com acetonitrila, limpeza do extrato por fase sólida dispersiva e análise por LC-ESI-MS/MS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e equipamentos

Padrões analíticos, Solventes e Reagentes

Moxidectina (pureza de 94,8%) e selamectina (SEL) (pureza de 97,6%) foram obtidas da European Pharmacopoeia Reference Standart (Strasbourg, France). Acetonitrila (ACN) grau de pureza HPLC foi obtida de J.T. Baker (USA). Metanol (MeOH) grau de pureza HPLC foi obtido de J.T. Baker (México). Trietilamina (TEA) grau de pureza PA (99%) foi obtida da Merck (Alemanha). Octadecil (C18) e amina primária/secundária (PSA) foram obtidos de UCT, Inc. (Bristol, USA).

A água usada para preparar as soluções foi purificada em sistema Mili-Q, modelo Plus system (Millipore, USA).

Soluções Padrões

Solução padrão estoque: foi preparada em ACN na concentração de 1 mg mL^{-1} , armazenadas em frascos de 10 mL e mantida em freezer a temperatura de $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Essa solução foi usada por um período de, no máximo, 6 meses.

Solução padrão intermediária: foi preparada diariamente pela diluição apropriada da solução estoque em acetonitrila na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e armazenadas sob refrigeração a 4°C .

Mix das soluções de trabalho – foram preparadas diariamente pela diluição das soluções intermediária da MOX e da SEL (padrão interno) utilizando, para tanto, fase móvel (FM) empregada na separação cromatográfica.

A FM foi composta por (A) ACN e (B) MeOH:H₂O (50:50 v/v) e trietilamina (TEA) adicionada em quantidade suficiente para se obter um pH de 8. A proporção entre as fases A:B foi de 75:25, v/v.

Amostras de soro de cordeiro

As amostras de soro de cordeiro utilizadas no presente estudo, incluindo as amostras branco foram fornecidas pelo Laboratório de Produção e Pesquisa em Ovinos e Caprinos (LAPOC), pertencente à Fazenda Experimental da Universidade Federal do Paraná, localizada na região metropolitana de Curitiba.

As amostras branco utilizadas para o estabelecimento das condições analíticas foram analisadas e os cromatogramas inspecionados quanto à presença de interferentes, que poderiam comprometer o desenvolvimento do método analítico. Nenhum interferente foi detectado nos tempos de retenção correspondentes a MOX e a SEL, garantindo a viabilidade das amostras branco.

Equipamentos

As análises cromatográficas foram realizadas usando um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Varian, USA) constituindo de um sistema de bomba binária (Varian ProStar 210) e um injetor automático do tipo Varian Pro Star (Varian ProStar 410 AutoSampler model). O cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massas em série, contendo uma fonte de ionização eletrospray (ESI)

seguido por um analisador do tipo triplo quadrupolo (QqQ), modelo Varian 1200L (USA). O software utilizado para a aquisição dos dados foi o Varian MS Workstation (versão 6).

Para a degaseificação da fase móvel e para o preparo das amostras foi empregado um banho de ultrassom (modelo Transonic 460/H ultrasonic bath da Elma, Germany). Para a medição e ajuste do pH da FM, utilizou-se um pHmetro modelo DM-20 (Digimed, Brasil). No preparo das amostras foi utilizado um agitador de tubos tipo vortex (Quimis, Brasil), um evaporador modelo HB4 Basic rotating evaporator (IKA, Germany), para concentração dos extratos; uma centrífuga (modelo Heraeus Multifuge 3L-R centrifuge (Thermo Scientific, USA) para a separação das fases sólida e líquida da amostra

Ensaio com os cordeiros

Estudo farmacocinético (Fase I)

Nessa primeira fase, objetivando a obtenção de soro para identificação e quantificação da molécula moxidectina no soro dos cordeiros, os animais foram confinados em baias individuais, com piso ripado suspenso, equipadas com comedouro e bebedouro individuais e alimentados com uma dieta composta por 70% de silagem de milho (volumoso) e 30% de concentrado, formulada para atender as exigências de cordeiros com potencial de crescimento rápido.

Para o estudo de disposição da MOX no soro foram selecionados aleatoriamente cordeiros recém desmamados (n=7), com idade entre 111 a 113 dias e o peso corporal variando entre 32,25 a 39 kg, que nunca haviam recebido tratamento com anti-helmíntico. Estes receberam uma única aplicação subcutânea de MOX 1% na dose de 0,2 mg kg⁻¹ de peso corpóreo. No dia da aplicação do anti-helmíntico, todos os animais foram submetidos a um jejum sólido de 12 horas e, posteriormente, pesados. A dose administrada foi calculada, individualmente, com base no peso do animal considerando que a concentração de MOX no medicamento utilizado era de 1%, tendo sido aplicada com auxílio de uma seringa graduada em escala de 0,1 mL.

O sangue foi coletado de todos os animais antes (dia zero) da aplicação do anti-helmíntico. Após a aplicação foram coletados 1,5 mL de sangue, de cada animal, nos

seguintes períodos: 6, 12, 18; 24, 30 e 36 horas e 2; 3; 5; 9; 14; 21; 28; 35 e 42 dias. As amostras colhidas foram mantidas sob refrigeração (4 °C) por, no máximo, duas horas antes de serem centrifugadas a 2500 g, por 15 minutos, para obtenção do soro. O soro foi armazenado em tubos de eppendorf e congelado a temperatura de -20 °C, até o momento das análises.

Avaliação dos métodos de controle parasitário em animais em pastagens (Fase II)

No estudo de campo (II), objetivando a quantificação do resíduo em animais submetidos aos métodos de controle de parasitoses efetivamente utilizados em criações comerciais, cordeiros (n= 40) da raça suffolk, que nunca haviam recebido tratamento com anti-helmíntico, foram monitorados quanto às infecções parasitárias, a partir de 40 dias de idade. Os cordeiros foram mantidos com suas mães em pastagem de Tifton-85 e submetidos a três programas para controle de endoparasitas para pequenos ruminantes: (1) tratamento preventivo a cada 28 dias; (2) tratamento após contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e (3) tratamento seletivo aplicando o método FAMACHA®.

No início dos tratamentos os cordeiros pesavam, aproximadamente, 23 kg e apresentavam 42 dias de idade. Para os animais correspondentes ao método de controle por contagem de OPG, a cada 14 dias foi realizada a coleta de fezes da ampola retal para contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG), segundo metodologia de Gordon e Whitlock (1939). Cada vez que os animais apresentaram OPG igual ou maior que 700 foram tratados com a MOX 1% injetável, na dose recomendada pelo fabricante (0,2 mg kg⁻¹ de peso corporal).

Na mesma oportunidade, para os animais correspondentes, aqueles aos quais foi aplicado ao método FAMACHA® (BATH *et al.*, 1996) a administração da MOX foi realizada nos animais que apresentaram grau FAMACHA® maior ou igual a 3, determinado através da coloração da mucosa ocular (graus de 1 a 5).

No caso dos animais sob tratamento preventivo, os mesmos receberam a MOX, na mesma dosagem, no dia 0 (entrada na área experimental) e a cada 28 dias, a partir de então.

No dia da aplicação do anti-helmíntico, os cordeiros que precisaram ser desverminados, foram submetidos a um jejum sólido de 12 horas e, posteriormente, pesados. A dose administrada foi calculada individualmente com base no peso do animal.

Para a coleta das amostras de soro foi respeitado o tempo de carência do fármaco de 28 dias para todos os animais. No momento da coleta, os cordeiros apresentavam em média 31 kg de peso corporal e 136 dias de idade, sendo coletados 1,5 mL de sangue de cada animal. As amostras foram mantidas refrigeradas por, no máximo, duas horas antes de serem centrifugadas por 10 minutos a 4000 g para obtenção do soro, os quais foram armazenados a temperatura de -20°C, para posterior análise.

Método analítico

Preparo da amostra

Amostras de soro branco (0,5 mL) foram adicionadas em tubos de polipropileno de 50 mL. A extração foi realizada com adição de 2 mL de ACN para favorecer a precipitação das proteínas, seguida de agitação em vórtex por 30s e centrifugação a 13855 g, por 5 min, a 5 °C. Para a etapa de *clean-up*, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno de 50 mL, contendo 100 mg de C18 e 0,75 mg de PSA. Os extratos foram novamente agitados em vórtex por 30s, centrifugados (13855g, 5 min, 5 °C) e refrigerados por 1 hora a 4 °C. Uma alíquota do sobrenadante (2,7 mL) foi transferida para balões de fundo redondo de 50 mL e evaporados até à secura em rota-evaporador a 40 °C. O resíduo foi resuspendido em 0,5 mL de fase móvel. Para facilitar a dissolução dos analitos, o balão foi colocado em um banho de ultrassom, por 30s. Por último, os extratos resultantes foram filtrados em membranas de celulose com poros de 0,22 µm de diâmetro (Whatman, EUA), diretamente no vial, e injetados no LC-ESI-MS/MS. O esquema da marcha analítica está ilustrado na Figura 1.

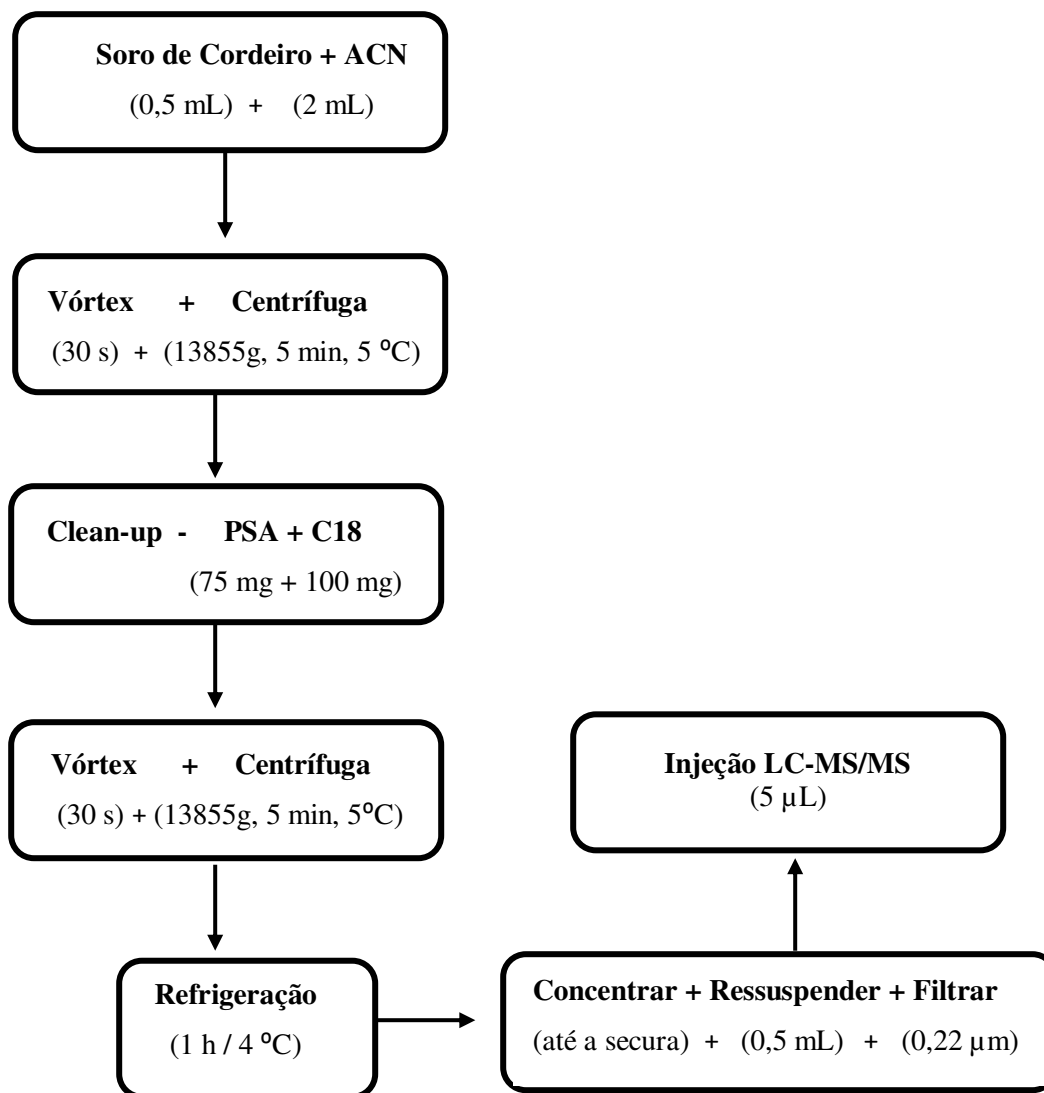


Figura 1. Fluxograma da marcha analítica.

Condições do sistema LC-ESI-MS/MS

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna analítica de fase reversa C18 (50 x 2,1 mm, 2,7 µm) Poroshel 120 EC-18 (Agilente Technologies, USA), precedida por uma coluna guarda de fase similar (30 x 2,1 mm, 2,7 µm), à temperatura ambiente (25 °C). O volume de injeção empregado foi de 5 µL, e a vazão da FM foi de 0,20 mL min⁻¹.

A FM foi filtrada em membranas de nylon obtidas de JFILTER (USA), com tamanhos de poros de 0,45 µm.

Para o sistema MS/MS (identificação e quantificação), foram estabelecidas as seguintes condições de ionização: temperatura da fonte ajustada em 50 °C, voltagem do capilar de -85 KV para a MOX e SEL, pressão e temperatura do gás de dessolvatação (Nitrogênio) equivalente a 29 psi e 280 °C, respectivamente. O gás de colisão utilizado foi o argônio e o gás de nebulização o ar. A voltagem do detector foi configurada em 2000 V. O método de aquisição MS/MS foi o monitoramento de reação múltipla (MRM), realizado no modo negativo. Para a MOX os fragmentos de transição (m/z) foram 638 > 108; 638 > 235, e para identificação da selamectina 769 > 226, 769 > 722. Os fragmentos de transição (m/z) 108 e 226 foram utilizados para quantificação e os fragmentos 235 e 722 para confirmação da MOX e SEL.

Validação do método

O método foi validado em base com as recomendações do guia de Validação de Métodos Analíticos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) e da Comunidade Europeia (EC, 2002), os quais estabelecem critérios de desempenho para os métodos analíticos destinados a determinação de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal. Assim, os parâmetros avaliados foram: linearidade, seletividade, efeito matriz, precisão intra e interdia, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

A seletividade do método foi avaliada por comparação do cromatograma obtido da análise de seis amostras de soro branco (n = 10) e das matrizes fortificadas, verificando-se a ausência de interferentes coeluintes com os analitos (MOX e SEL) ou próximo ao tempo de retenção.

A linearidade e a sensibilidade foram estabelecidas a partir das curvas de calibração em solução padrão, extrato fortificado e matriz fortificada em 7 níveis de concentração (5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 ng mL⁻¹). Os resultados obtidos foram analisados pelo método de mínimos quadrados e a linearidade expressa como o coeficiente de correlação linear (R²).

Para a obtenção do extrato fortificado, amostras de soro branco foram submetidas ao processo de extração estabelecido (Figura 1) e aos extratos obtidos foram, adicionadas

concentrações conhecidas das substâncias a analisar (MOX e SEL). Para a obtenção da matriz fortificada, foram adicionadas concentrações conhecidas dos analitos de interesse às amostras de soro branco e, posteriormente, submetidas ao procedimento de extração.

Outro estudo importante para métodos analíticos empregando a técnica de LC-MS/MS é a avaliação do efeito matriz, destinado a verificar as interferências causadas por quaisquer elementos que compõem a matriz de amostragem, que poderiam gerar diminuição ou aumento de sinal. O efeito matriz foi avaliado pela realização dos testes F e t de Student e os efeitos obtidos para cada um dos analitos foram expressos em porcentagem. Para o cálculo, compararam-se os resultados obtidos para o extrato fortificado, nos níveis de concentração correspondentes a 20, 40, 60 ng mL⁻¹, com os resultados obtidos para os mesmos níveis de concentração dos analitos dissolvidos em solvente. A diferença de sinal obtida no extrato e na solução, em cada nível de concentração, foi dividida pelo sinal do analito em solução.

A precisão do método foi determinada em duas etapas: (i) repetibilidade (intra-dia) e (ii) a precisão intermediária (inter-dia). A precisão foi avaliada em 3 níveis de fortificação do soro (0,5; 10,0 e 20,0 ng mL⁻¹), sendo 5 replicatas para cada nível. A repetibilidade foi expressa pelo coeficiente de variação (CV) dos resultados de cada nível de fortificação, analisados no mesmo dia, com a mesma amostra e usando o mesmo instrumento. A precisão intermediária foi expressa pelo CV dos resultados das análises realizadas em três dias diferentes (n = 3), pelo mesmo analista, usando o mesmo instrumento.

A exatidão foi avaliada através do teste de recuperação da matriz fortificada, em 3 níveis de fortificação (0,5; 10,0 e 20,0 ng mL⁻¹). Cada nível de fortificação foi avaliado utilizando 5 replicatas. Os resultados foram expressos como a percentagem das concentrações média fortificadas na matriz em relação a concentração fortificada em solução padrão na mesma concentração.

Os limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estabelecidos através da fortificação da matriz, em baixos níveis de concentração. O LOD foi expresso como a menor concentração cujo sinal equivale a 3 vezes a relação sinal/ruído. Enquanto que o LOQ foi estabelecido como o menor nível capaz de produzir um sinal equivalente a 10 vezes a relação sinal/ruído, com precisão de 20 % e exatidão de 80-120 %.

Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos da moxidectina no soro

A partir das concentrações sorológicas de MOX foi construída uma curva semi-logarítmica considerando a concentração do fármaco versus o tempo pós-aplicação. A partir dessa curva, foram obtidos os seguintes parâmetros sobre o fármaco utilizado, segundo Gibaldi e Perrier (1982):

- Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$);
- Concentração máxima ($C_{\text{máx}}$);
- Tempo da concentração máxima ($T_{\text{máx}}$);
- Área sob a curva (AUC);
- Constante de eliminação (K_e);

O tempo de meia vida foi obtido pela equação $T_{1/2} = \ln(2)/k_e$, onde $\ln$ é o logaritmo neperiano. As concentrações de pico máximo ($C_{\text{máx}}$) e o respectivo tempo para atingir esta concentração ($T_{\text{máx}}$) foram lidos a partir do traçado da curva de concentração versus o tempo. A área sob a curva da concentração sorológica em relação ao tempo, de zero até a última concentração detectada ($t = 9$ dias) (AUC 0-t) foi calculada pela aplicação da regra trapezoidal, usando-se como unidade a quantidade/volume versus a hora. A extrapolação dessas áreas para o infinito (AUC 0- ∞) foi feita pela adição do valor de C_t/k_e às (AUC 0-t) calculadas, onde C_t é a última concentração plasmática do fármaco detectado após a administração deste. A constante de eliminação foi estimada pela regressão linear dos pontos da fase de eliminação em gráfico linear-log, pelo método dos mínimos quadrados do tempo x logaritmo da concentração. As médias e desvios padrão (DP) foram calculados para todos os parâmetros investigados. Os dados foram submetidos a análise estatísticas utilizando o software R (<http://www.r-project.org/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Condições cromatográficas

A determinação das lactonas macrocíclicas (LMs) utilizando LC-ESI-MS/MS como sistema de detecção pode ser realizada através de dois modos de ionização: o modo positivo e o modo negativo. No presente estudo, os dois modos de ionização foram testados.

No modo de ionização por eletronebulização positivo empregou-se uma fase orgânica composta por acetonitrila e uma fase aquosa formada por uma solução tampão de acetato de amônia 5 mM, acidificada com 0,1% de ácido acético, na proporção de 75:25 v/v.

A utilização de sais de amônia na fase móvel, com detecção baseada na ESI positiva, permite detectar as LMs que contenham átomos de nitrogênio, através da monitorização do analito protonado $[M + H]^+$, como é o caso da MOX e SEL. No presente estudo, observou-se uma abundância na formação dos adutos de sódio $[M + Na]^+$ e potássio $[M + K]^+$ e, em menor proporção, do íon da MOX protonado $[M + H]^+$. A presença dos adutos de sódio e potássio pode ser atribuída aos vestígios dos mesmos nos extratos da matriz ou do método, e a sua monitorização não é recomendada por resultarem em curvas de calibração não linear (Kauffman *et al.*, 2011; Durden, 2006; Wu *et al.*, 2001). O íon protonado $[M + H]^+$ apresentou uma baixa intensidade de sinal, produzindo íons produtos de sinal não significativos, quando provenientes do íon precursor $[M + H]^+$.

Em estudo realizado por Durden (2006), ao monitorar as concentrações de MOX e SEL em modo positivo, utilizando fonte de ESI, a concentração dos compostos analisados tendeu a diminuir rapidamente com o aumento da concentração do tampão de amônia (Stout *et al.*, 2000; Ali *et al.*, 2000). Este fato pode justificar a baixa intensidade do sinal para o íon protonado $[M + H]^+$ observado no presente estudo. A concentração do sal de amônia empregado e porcentagem dos ácidos utilizados nos artigos diferem significativamente, sugerindo-se otimizar o pH e força iônica da fase móvel para criar condições favoráveis para a ionização dos compostos que abrangem o método analítico.

Como alternativa aos resultados encontrados, o modo de ESI negativo foi testado. Na análise pelo modo negativo com fonte de ESI, empregou-se uma fase orgânica composta por acetonitrila e uma fase aquosa adicionada de TEA (75:25 v/v), a fim de se obter um pH próximo de 8,0.

A modificação da fase móvel favoreceu a ionização do composto, resultando em um aumento significativo do sinal. A adição de trietilamina na FM visou elevar o pH a valores superiores ao do pKa do analito, favorecendo a abstração de prótons no composto. O cromatograma obtido pelo modo ESI negativo apresentava um tempo de corrida de 12 min e uma baixa resolução nos picos. Como alternativa, 50% da água adicionada na fase aquosa foi substituída por metanol. A adição de metanol diminuiu a polaridade da fase móvel, contribuindo para que os analitos apresentassem uma maior afinidade por esta fase e, portando, eluissem mais rapidamente da coluna analítica. Deste modo, o tempo de corrida foi reduzido a metade, passando de 12 min para 6 min. O tempo de retenção da MOX passou para 2,6 min e o tempo de retenção do padrão interno para 4 min. A diferença nos tempos de retenção dos analitos e na resolução dos picos pode ser observado na Figura 2. A SEL foi escolhida como padrão interno por ser improvável a sua utilização em animais produtores de alimentos e ser quimicamente similar à MOX.

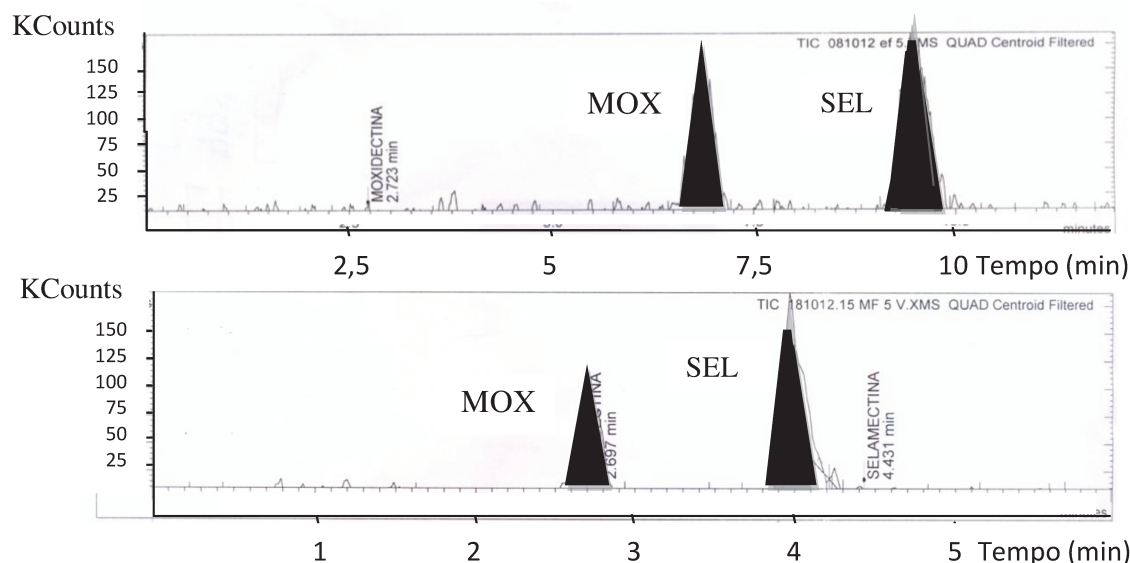


Figura 2. Cromatogramas da MOX e SEL na fase móvel (a) sem adição de metanol e (b) com adição de metanol.

O método isocrático foi utilizado no presente trabalho uma vez que a MOX e o padrão interno apresentavam picos bem resolvidos e com curto tempo de corrida, não sendo necessário o desenvolvimento de um gradiente.

O volume de injeção inicialmente testado foi de 10 μL , observando-se o saturamento da coluna analítica após injeções consecutivas do extrato do soro. Este fato pode ser comprovado pela alteração do efeito matriz, ou seja, pela mudança na capacidade de ionização da MOX, conforme apresentado na Figura 3. Deste modo, foi testado um volume de injeção de 5 μL , associado com um processo de limpeza dos extratos, não tendo sido mais verificado a presença de efeito matriz.

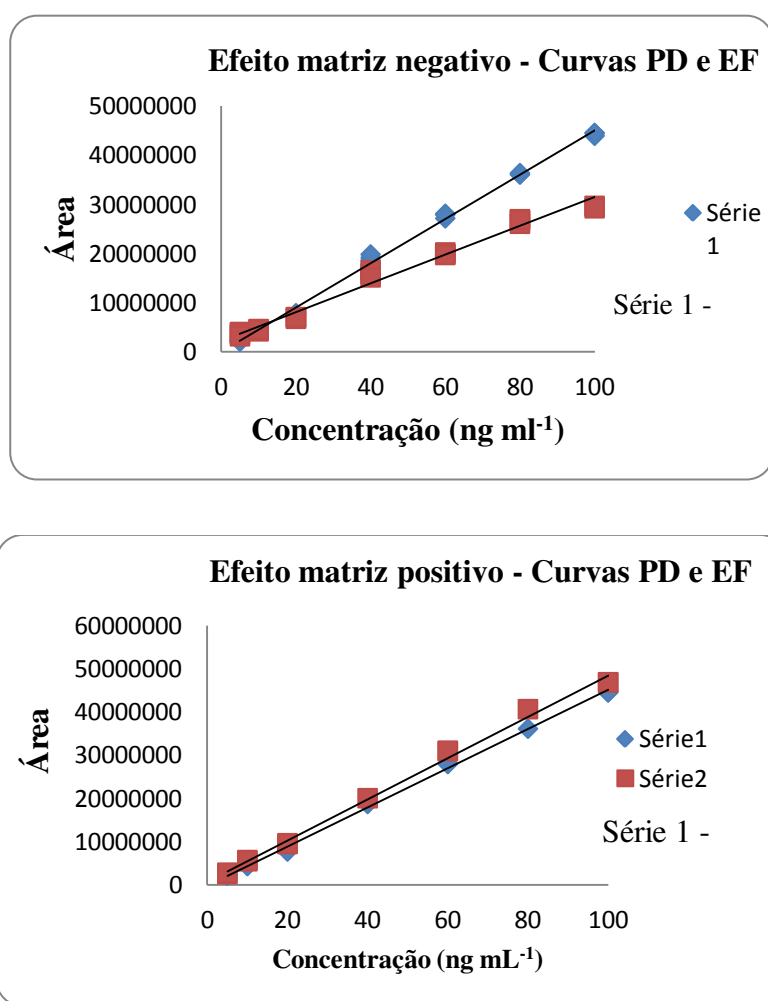


Figura 3. Mudança no comportamento de ionização da MOX após injeções consecutivas das amostras a um volume de 10 μL , verificado pela comparação das curvas em solução padrão (PD) e extrato fortificado (EF).

As condições ótimas para ionização dos analitos no ESI-MS/MS foram determinadas de forma a alcançar a maior sensibilidade de detecção dos íons na análise por espectrometria de massas. Para tanto, foram realizadas infusões diretas no espectrômetro de massas de solução de MOX e SEL na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada composto, utilizando fluxo de $20 \mu\text{L min}^{-1}$. Um ajuste fino de cada parâmetro foi realizado para cada analito, obtendo-se como condições ótimas de trabalho: temperatura da fonte 50°C , voltagem do capilar -85 KV (MOX e SEL), pressão e temperatura de dessolvatação do gás equivalente a 29 psi e 280°C , respectivamente. A voltagem do detector foi configurada em 2000 V .

Para a quantificação e confirmação da identidade dos analitos, o MAPA (2011) e a Comunidade Europeia (EC, 2002), estabelecem que os métodos que empregam analisadores de massa são particularmente adequados para a confirmação dos resíduos por fornecerem medidas das massas moleculares e informações da estrutura química. O uso de técnicas de espectrometria de massas de alta e baixa resolução atende aos critérios para confirmação de identidade de resíduos baseado no sistema de pontos de identificação (IP), que é relacionado à quantidade de íons fragmentos. Tratando-se de analisadores de massas de baixa resolução, como é o caso de analisadores triplo quadrupolos, quatro IP são necessários para confirmação (EC, 2002). Dessa forma o método desenvolvido atinge os 4 IP requeridos para a confirmação da identidade da MOX e SEL, pelo monitoramento do íon molecular (equivalente a 1 IP) e dois íons fragmentos (1,5 IP para cada íon fragmento). O íon molecular e as duas transições de sinal mais intenso da MOX e da SEL são apresentadas na (Tabela 1).

Tabela 1. Fragmentos de identificação e confirmação dos analitos.

Fármaco	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g/mol)	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)
MOX	$\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{NO}_8$	639,8	638	108 e 235
SEL	$\text{C}_{43}\text{H}_{63}\text{NO}_{11}$	769,9	768	226 e 722

Preparo da amostra

Os estudos iniciais para o estabelecimento e otimização das etapas envolvidas no processo de preparo da amostra foram realizados tomando como referência procedimentos descritos na literatura (Cittrackarn *et al.*, 2009; Gockbulut *et al.*, 2009; Lifschitz *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2010). Assim, o procedimento foi baseado na extração líquido-líquido com o uso de ACN, que além de remover o analito da matriz também é responsável pela precipitação das proteínas plasmáticas. Também, Kinsella *et al.*, (2009) afirmaram que a utilização concomitante de PSA e C18 promove uma satisfatória limpeza dos extratos, com remoção de aproximadamente 90% dos co-extrativos da matriz, e proporciona altos níveis de recuperação. Segundo esses autores, o emprego do PSA fornece adequadas recuperações para analitos monitorados no modo de ionização positivo, mas baixas recuperações no modo negativo. Enquanto o C18 fornece altas recuperações para análise no modo de ionização negativo e satisfatória recuperações dos analitos no modo positivo.

Considerando que o espectrômetro de massas é um analisador seletivo, que permite a identificação dos analitos conforme a razão massa/carga, inicialmente os extratos foram analisados no LC-ESI-MS/MS sem a realização de uma etapa de limpeza. Contudo, o extrato obtido ocasionou o entupimento do capilar da fonte de íons por eletro nebulização (ESI) e a “contaminação” da pré-coluna e coluna do cromatógrafo. Assim, várias condições de preparo de amostra foram testadas, dentre elas a utilização de uma etapa de limpeza por extração dispersiva em fase sólida (SPE-d), utilizando-se os adsorventes PSA (amina primária e secundária) e octadecil (C18), incluindo-se a variação da quantidade de C18 empregada (75, 100 e 150 mg), assim como o uso de MgSO_4 (150 mg) (Anastassiades *et al.*, 2003).

Cabe mencionar que a quantidade do adsorvente PSA utilizado no teste (75 mg) baseou-se no estudo realizado por Hashimoto *et al.*, (2012), o qual realizou um delineamento composto central e determinou que a quantidade ótima de PSA para limpeza dos extratos de verde malaquita e verde de leucomalaquita em filé de tilápia é de 25 mg do adsorvente para cada 1 mL do extrato. O sorvente PSA apresenta um elevado efeito quelante, contribuindo para a retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos

polares presentes na matriz (Prestes et al., 2009; Hashimoto *et al.*, 2012), e o C18 tem a função de remover grupos lipofílicos. O MgSO_4 foi escolhido como sal extrator devido a sua maior capacidade de remover a água quando comparado a outros sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento (entre 40 e 45 °C) da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares.

Verificou-se que a adição de MgSO_4 não influenciou nos resultados obtidos, deste modo, optou-se por não empregar o sal no preparo da amostra. O mesmo foi constatado para concentrações superiores a 100 mg de C18. Todavia, o uso concomitante de PSA e C18 forneceu melhor eficiência de limpeza das amostras, quando comparado com a utilização somente do PSA. Desta forma, optou-se por realizar a extração da MOX em uma única etapa, sendo o extrato submetido a uma etapa de limpeza com PSA (75 mg) e C18 (100 mg). Entretanto, este extrato ainda apresentava efeito matriz positivo. Assim sendo, com o propósito de melhorar a eficiência do processo de limpeza do extrato foi inserida uma etapa adicional em que os extratos, juntamente com os adsorventes, eram mantidos sob-refrigeração a 4 °C, por 1 hora. Esta etapa visou minimizar o efeito matriz. Na Figura 4 são apresentadas as curvas em solução padrão e extrato fortificado para o método de extração desenvolvido, verificando-se ausência de efeito matriz.

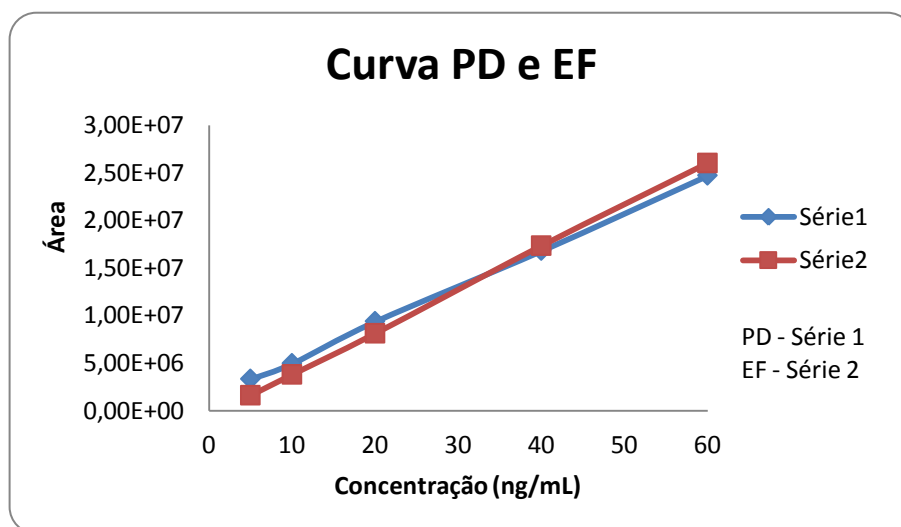


Figura 4. Ausência de efeito matriz significativo ao serem comparadas as curvas em solução padrão (PD) e extrato fortificado (EF) na faixa de trabalho estudada.

Validação do método analítico

O método analítico desenvolvido para a determinação de MOX em soro de cordeiro foi validado pela determinação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, efeito matriz, precisão intra e interdias, exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

A seletividade foi avaliada verificando-se a ausência de picos interferentes no tempo de retenção dos analitos (MOX e SEL), através da comparação do cromatograma obtido com amostras branco (n=10) com o proveniente da análise da matriz branco fortificada com MOX e SEL (n=10). Na Figura 5a, é apresentado o cromatograma de uma amostra branco, verificando-se a presença de um interferente próximo ao tempo de retenção da MOX, com m/z de 528. Deste modo, o m/z 528 foi substituído por outro sinal de boa intensidade, o íon de m/z 108. No monitoramento deste íon não foram verificados interferentes coeluinto com os compostos estudados (Figura 5b). Na Figura 5c é apresentado o cromatograma da matriz fortificada com 5,0 ng mL⁻¹ de MOX e 40 ng mL⁻¹ de SEL, verificando-se um sinal apreciável do analito, em relação ao ruído da linha de base.

Para MOX o efeito matriz foi avaliado pela comparação dos níveis de concentração da curva analítica no extrato fortificado, com os do analito em solvente. Verificou-se ausência de efeito matriz, o que dá suporte ao processo de validação do método (Figura 6).

Segundo as recomendações do guia de validação do MAPA (2011), as curvas analíticas devem conter pelo menos cinco níveis de fortificação. No presente estudo, as curvas analíticas foram compostas por sete níveis, a saber: 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 ng mL⁻¹ para, assim, poder assegurar a maior faixa possível de quantificação da MOX no soro de cordeiro.

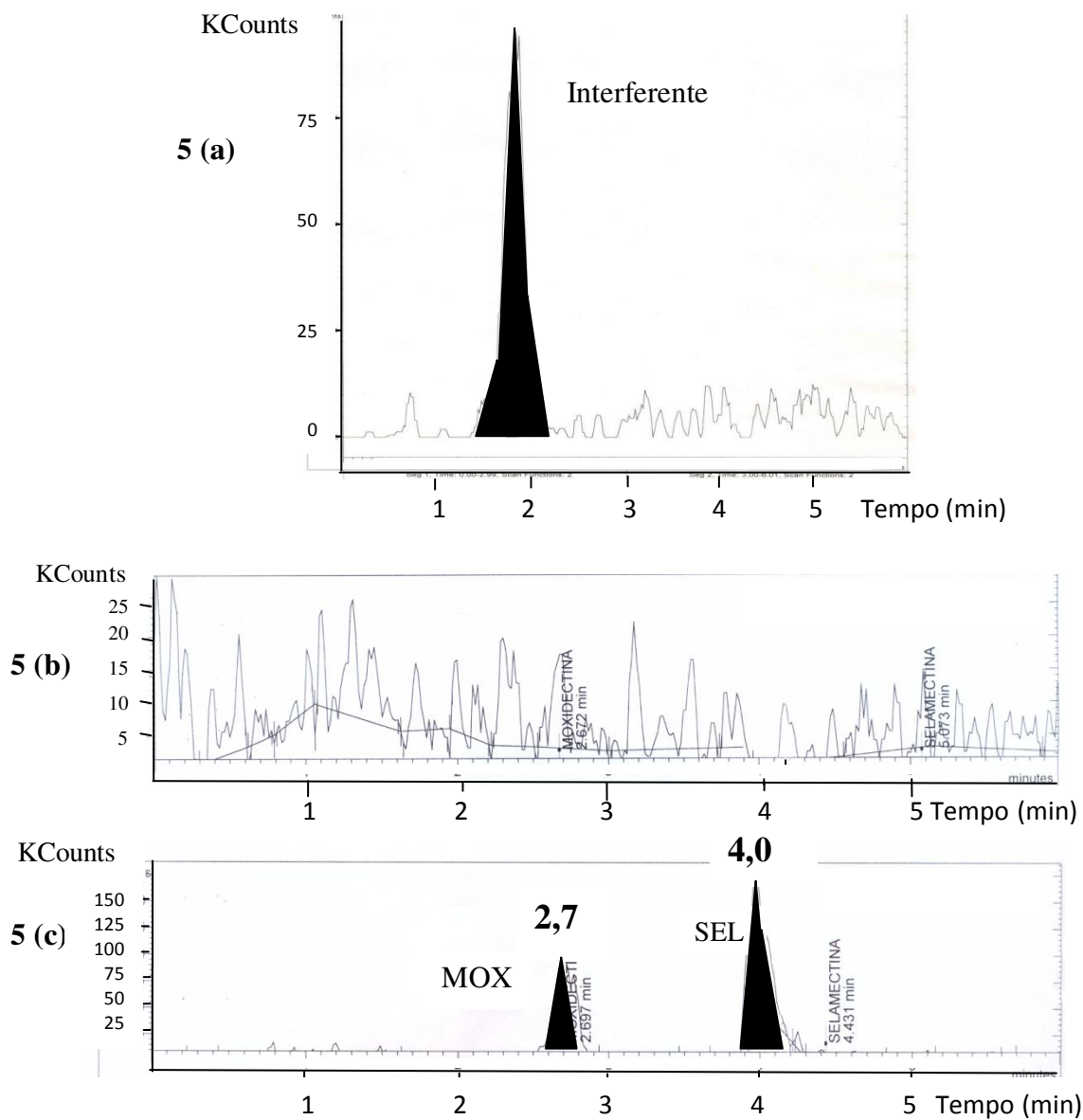


Figura 5. Cromatogramas das amostras: (a) de soro branco com monitoramento dos fragmentos m/z 528 e 235 da MOX, (b) de soro branco com monitoramento dos fragmentos m/z 108 e 235 da MOX e (c) da matriz fortificada com 5 ng mL^{-1} de MOX e 40 ng mL^{-1} de SEL, monitorando os fragmentos m/z 108 e 235 da MOX.

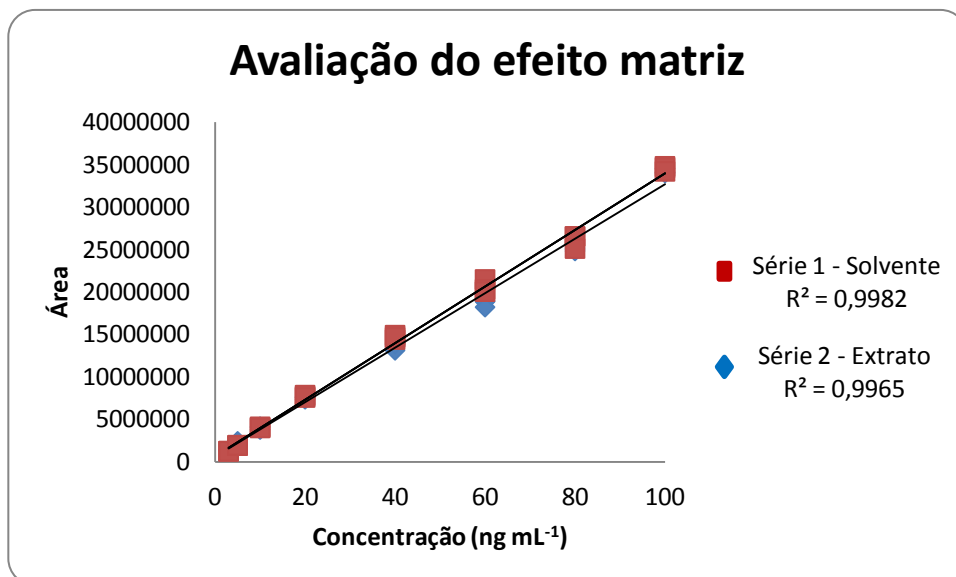


Figura 6. Avaliação do efeito matriz pela comparação das curvas em solvente e extrato fortificado.

A linearidade e a sensibilidade do método foram obtidas a partir das curvas analíticas matrizadas (matriz fortificada), e são representadas pelo coeficiente de correlação linear (r^2) e pelo coeficiente angular da curva (Figura 7). Para a construção da curva analítica, a área do pico da MOX em cada nível de concentração foi dividida pela área do padrão interno (SEL), adicionado em uma concentração fixa de 40 ng mL⁻¹. O baixo coeficiente de correlação linear obtido ($r^2 = 0,9458$) deve-se a má reprodutibilidade da área SEL. Deste modo, o padrão interno não foi mais utilizado no processo de validação.

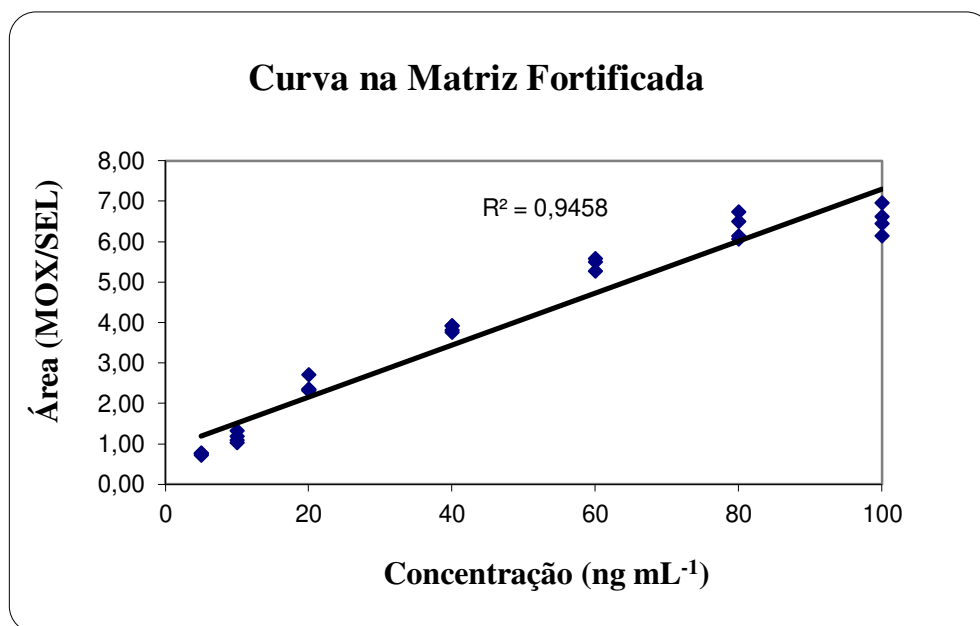


Figura 7. Curva analítica da matriz fortificada obtida pela divisão da área de MOX/SEL (concentração do padrão interno 40 ng mL⁻¹).

Ao avaliar a linearidade e a sensibilidade do método nas curvas analíticas em solução padrão, extrato fortificado e matriz fortificada, sem considerar a área do padrão interno (SEL), os valores obtidos pela integração da área dos picos da MOX apresentaram coeficientes de correlação linear superiores a 0,99 (Figura 8), o que atende as recomendações dos guias de validação adotados no presente estudo (MAPA, 2011 e EC, 2002), os quais exigem um coeficiente de correlação acima de 0,99.

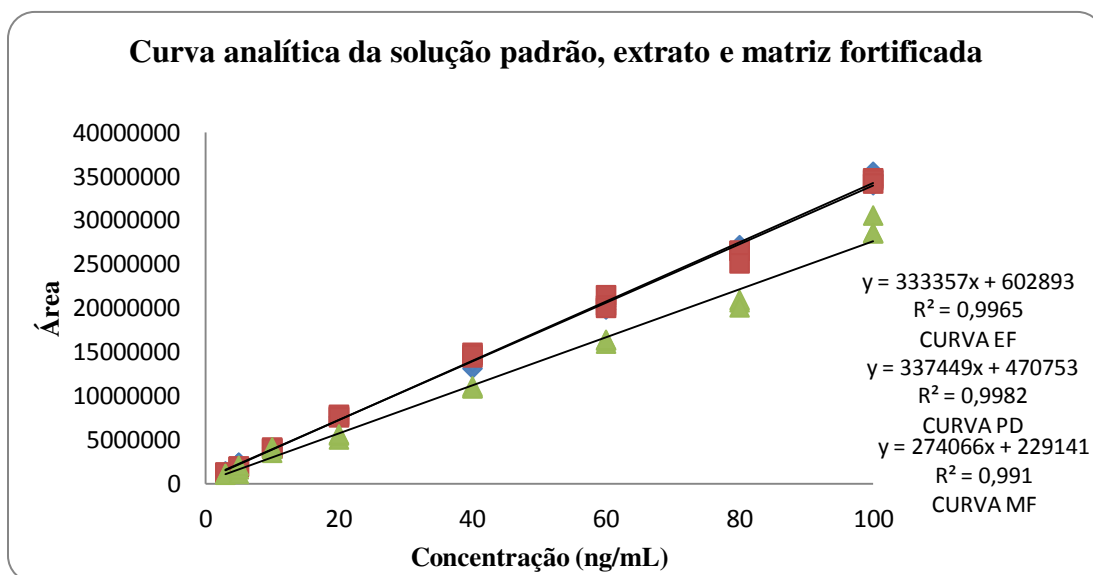


Figura 8. Curva analítica da moxidectina em solvente, extrato e matriz fortificada.

Ao avaliar o gráfico do resíduo (Figura 9) verifica-se que os pontos de menor concentração da curva analítica, ou seja, 3,0 e 5,0 ng mL⁻¹ apresentam-se mais afastados do modelo de ajuste da reta, indicando a tendência de resíduos. Apesar desta tendência, as curvas do extrato fortificado, solução padrão e matriz apresentaram um CV < 20% para todos os pontos da faixa da curva entre 5,0 e 100,0 ng mL⁻¹, sendo passíveis sua utilização para fins de quantificação.

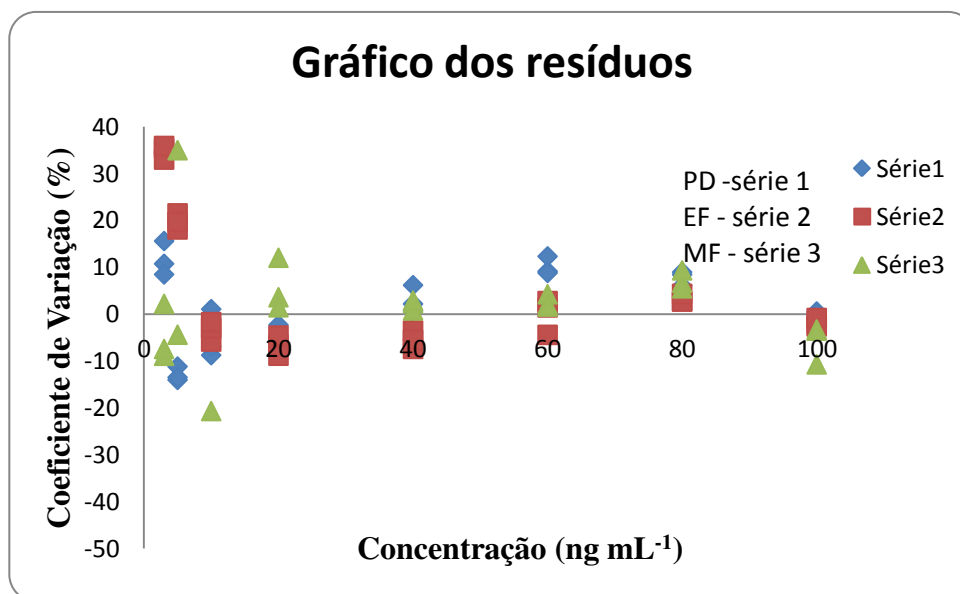


Figura 9. Gráfico dos resíduos das curvas em solução padrão (PD), extrato (EF) e matriz fortificada (MF).

A avaliação do LOD e LOQ para determinação de resíduos de fármacos veterinários em alimentos não é contemplada pela Comunidade Europeia (2002), nem pelo MAPA (2011). Estes guias de validação recomendam que sejam reportados o limite de decisão ($CC\alpha$ - limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro α) e a capacidade de detecção ($CC\beta$ - teor mais baixo que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro β). Contudo, o $CC\alpha$ e $CC\beta$ apenas são considerados quando há necessidade de determinar se uma amostra está ou não conforme com relação ao limite máximo de resíduo (LMR) ou ao limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) legalmente estabelecidos. No presente estudo em que foi avaliado o perfil farmacocinético da MOX a necessidade foi a de estabelecer o limite de quantificação LOQ, ou seja: a menor quantidade do analito no soro que poderia ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Deste modo, seguiram-se outros guias de validação (FAO, 1997; FDA, 2001; IUPAC, 2002), que recomendam a determinação de LOQ e LOD tomando-se como base a razão sinal/ruído de amostras branco, nos tempos de retenção correspondentes aos dos analitos. O LOD foi estabelecido a partir da razão sinal/ruído igual

a 3. O LOQ foi estabelecido a partir da razão sinal/ruído igual a 10. Amostras com nível de fortificação no valor do LOQ foram injetadas 10 vezes e determinado o CV (%) das respostas. O LOQ foi estabelecido como o menor ponto da curva analítica que apresentou CV menor que 20 %. Assim, o LOD e LOQ foram de 2,0 ng mL⁻¹ e 5,0 ng mL⁻¹, respectivamente.

Os resultados de exatidão e precisão do método estão apresentados na Tabela 2. Os níveis de concentração selecionados foram os níveis de menor concentração da faixa de trabalho estudada, ou seja: 5,0; 10,0 e 20,0 ng mL⁻¹. Vale ressaltar que quanto menor a concentração de um analito, maior será o seu coeficiente de variação (Figura 9). Deste modo, garantindo a precisão e a exatidão nos pontos mais dispersivos, automaticamente asseguramos também um CV < 20 % nos níveis de maior concentração da curva analítica, pois os mesmos tendem a apresentar alta homogeneidade.

Os valores médios de exatidão, obtidos mediante ensaios de recuperação, situam-se entre 80,0 e 107,3%, estando de acordo com os valores preconizados pelo MAPA (2011) e EC (2002) que estabelecem valores no intervalo de 70 a 110 %.

A precisão intradia e interdias foi expressa como o coeficiente de variação (CV %) dos resultados de três diferentes níveis de fortificação (5,0; 10,0 e 20,0 ng mL⁻¹), em cinco replicatas para cada nível, analisadas em condições de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial, respectivamente. Segundo a Comunidade Europeia (EC, 2002) e o MAPA (2011), os valores de precisão devem ser inferiores a 20% para compostos em níveis de concentração menores que 100 ng mL⁻¹. Os valores calculados para a precisão intradia situam-se entre 1,7 e 6,7 % e os de interdia entre 2,1 e 6,0 %, o que atende aos requisitos dos guias de validação.

Os valores dos parâmetros de validação do método para determinação de MOX em soro de cordeiro são apresentados na Tabela 2.

Avaliação da disposição da moxidectina no soro de cordeiros

No estudo de avaliação da disposição da MOX no soro de cordeiros as amostras foram analisadas utilizando o método desenvolvido e validado. Visando assegurar a

qualidade dos dados obtidos, uma solução padrão de MOX na concentração de 10 ng mL⁻¹, foi intercalada a cada 10 injeções no sistema cromatográfico (LC-ESI-MS/MS) das amostras analisadas de soro de cordeiro. Uma replicata verdadeira de amostra fortificada também foi injetada previamente a análise das amostras.

Tabela 2. Valores dos parâmetros de validação do método por LC-ESI-MS/MS para determinação de moxidectina (MOX) em soro de cordeiro.

PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	
Faixa de trabalho (ng mL⁻¹)	5,0-100,0
Linearidade (r²)	0,99
Efeito Matriz (%)	
20 ng mL ⁻¹	1,8
40 ng mL ⁻¹	8,0
60 ng mL ⁻¹	1,9
LOD (ng mL⁻¹)	2,0
LOQ (ng mL⁻¹)	5,0
Precisão Intra-Dia (CV %)	
5,0 ng mL ⁻¹	6,7
10,0 ng mL ⁻¹	2,0
20,0 ng mL ⁻¹	1,7
Precisão Inter-Dia (CV %)	
5,0 ng mL ⁻¹	6,0
10,0 ng mL ⁻¹	2,1
20 ng mL ⁻¹	2,9
Exatidão (% Recuperação)	
5 ng mL ⁻¹	82,4-89,8
10 ng mL ⁻¹	80,0-98,3
20,0 ng mL ⁻¹	83,7-107,3

CV: Coeficiente de Variação.

A MOX foi administrada por via subcutânea ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ peso corpóreo). A primeira amostra em que o fármaco foi detectado foi após 6h do início do tratamento, tendo a concentração da MOX no soro aumentado progressivamente até alcançar a concentração média máxima ($C_{\text{máx}}$) de $8,5 \pm 2,81 \text{ ng mL}^{-1}$, no tempo médio máximo ($T_{\text{máx}}$) de 1 dia (Figura 10).

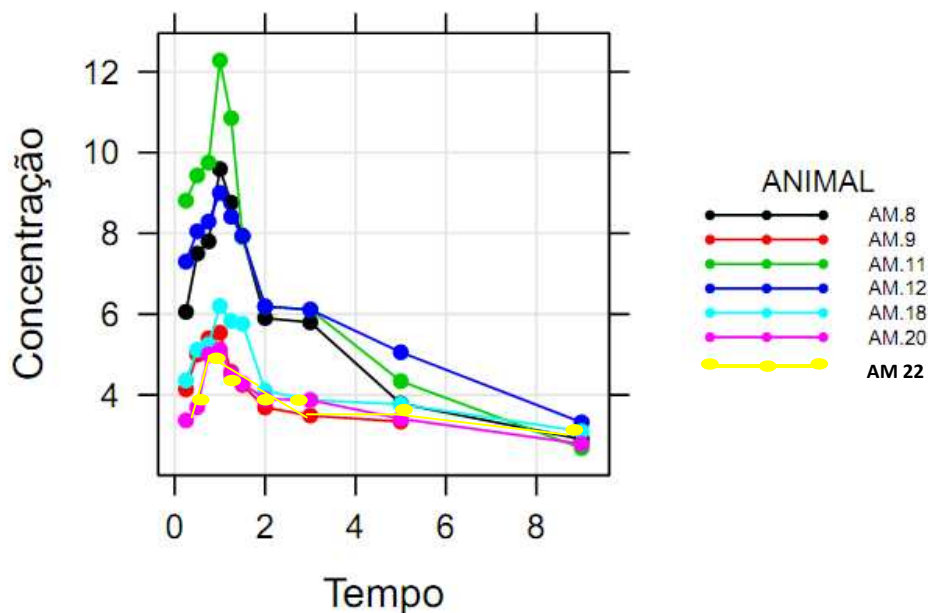


Figura 10. Perfil da concentração de moxidextina (MOX) no soro de cordeiros versus tempo, após a administração subcutânea de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ peso corpóreo ($n=7$).

Os parâmetros que descrevem a cinética de disposição da MOX são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros farmacocinéticos da moxidectina (MOX) em soro de cordeiro, após administração subcutânea de 0,2 mg kg⁻¹ peso corpóreo.

PARÂMETROS	MOX (Média ± DP)
C _{máx} (ng mL ⁻¹)	8,5 ± 2,81
T _{máx} (dias)	1
AUC ₀₋₉ (ng dia.mL ⁻¹)	45,711 ± 8,80
AUC _{0-∞} (ng dia.mL ⁻¹)	82,42 ± 8,02
T _{1/2} (dia)	7,66 ± 1,62
Ke (dia)	0,09 ± 0,18

DP = Desvio Padrão; C_{máx} = pico de concentração máximo; T_{máx}= tempo para alcançar C_{máx}; Ke = taxa de eliminação constante na fase terminal; t_{1/2} = tempo de eliminação de meia vida; AUC_{0-∞} = area em baixo da curva extrapolada para o infinito, AUC₀₋₉ de zero até a última concentração detectada.

Em relação aos valores de C_{máx} verificou-se grande variabilidade entre os cordeiros (5,12 a 12,28 ng mL⁻¹). Resultados semelhantes foram relatados por Death *et al* (2011), os quais avaliaram o perfil da MOX em marsupiais, verificando valores de C_{máx} entre 55,7 a 142 ng mL⁻¹, após administração subcutânea de 0,2 mg kg⁻¹ peso corpóreo (pc), e por Hunter *et al* (2004), que avaliaram o perfil da MOX em lhamas e alpacas após administração tópica de 0,5 mg kg⁻¹ pc. Os autores relataram variação de C_{máx} entre 0,286–1,27 ng mL⁻¹ para as lhamas e 0,213–0,879 ng mL⁻¹ para as alpacas. O número de concentrações detectáveis de MOX em lhamas e alpacas foi limitado, de modo que os autores não puderam determinar os demais parâmetros farmacocinéticos, apenas C_{máx} e T_{máx}. Outros autores (Alvinerie *et al.*, 2008; AntoniĆ *et al.*, 2011; Ballent *et al.*, 2011) que avaliaram o perfil farmacocinético da MOX apenas apresentaram os valores médios de C_{máx}, com seus respectivos desvio padrão, não permitindo a comparação da variabilidade entre os animais. Entretanto, pode-se concluir que dados relatados na literatura e os do presente estudo indicam que há grande variabilidade inter e intra-espécie em relação ao C_{máx} da MOX.

Dupuy *et al.*, (2003) estudou a farmacocinética da MOX no plasma de cordeiros machos, com peso corpóreo entre 20 a 37 kg e apresentando seis meses de idade, após administração subcutânea de 0,2 mg kg⁻¹ pc. A concentração máxima observada no plasma de cordeiros (raça Lacaune) foi de 14,49 ng mL⁻¹, semelhantes a alguns dos valores encontrados no presente estudo. Contudo o T_{máx} relatado foi de 0,29 dias, valor significativamente menor daquele verificado neste estudo, indicando no nosso caso uma passagem para a circulação sanguínea mais lenta. Este fato pode estar relacionado a condição corporal dos animais, uma vez que a raça Lacaune apresenta maior aptidão para produção de leite e a raça suffolk para carne, portanto, apresentam composição corporal diferente, o que pode interferir na biotransformação do fármaco.

Os níveis de MOX no soro diminuíram progressivamente após 24 horas da administração da dose, com modificações significativas na disposição da MOX, apresentando, com 3 dias após aplicação do fármaco, uma taxa de disposição constante na fase terminal de 0,09 ± 0,05 dias. O tempo de meia vida de eliminação do fármaco na fase terminal do perfil de concentração-tempo também diminuiu, apresentando valores de 7,66 ± 0,05 dias. A concentração de MOX permaneceu quantificável no soro por um período de até 9 dias após o tratamento, confirmando o longo tempo de residência do fármaco no organismo.

A área sob a curva de concentração-tempo é geralmente considerado como sendo o mais pertinente para a avaliação da extensão da exposição ao fármaco, o valor verificado foi de 82,42 ± 8,02 ng dia.mL⁻¹, o qual é semelhante ao relatado por Dupuy *et al.*, (2003) em cordeiros (73,26 ± 25,60 ng dia.mL⁻¹) e inferior ao relatado por Escudero *et al.*, (1999) em cabras (136 ng dia.mL⁻¹). Escudero *et al.*, (1999) avaliou cabras da raça Murciano-Granadina, com peso corpóreo entre 31 a 45,8 kg, e apresentando entre 1,5 a 3 anos de idade. Verificou-se que os valores inferiores de AUC para MOX obtidos no presente estudo, quando comparados com Escudero, podem estar relacionados ao menor armazenamento da gordura corporal em cordeiros quando comparado com o animal adulto, carneiro e ovelha (Dupuy *et al.*, 2001). Estudos anteriores demonstraram que a farmacocinética do endectocida apresenta variabilidade conforme o animal avaliado e a espécie (Lanusse *et al.*, 1997; Dupuy *et al.*, 2001).

A eliminação de semi-vida plasmática da MOX em cordeiros foi menor do que os valores citados para os bovinos e caprinos adultos que receberam o mesmo tratamento (Lanusse *et al.*, 1997; Escudero *et al.*, 1999). Lanusse *et al.*, (1997) avaliaram o perfil farmacocinético em bovinos machos, com peso corpóreo entre 180-210 kg e apresentando 10 meses de idade, após administração subcutânea de MOX a 0,2 mg kg⁻¹ pc, obtendo valores de eliminação de meia vida plasmática de 14,5 ± 1,2. Este fato pode ser justificado pela dose administrada a um animal adulto que é de 2-4 vezes maior que a do cordeiro, contribuindo para que uma maior concentração da droga possa depositar-se no organismo do animal. O depósito da MOX no tecido adiposo atua como um reservatório para a droga, liberando-a gradualmente na corrente sanguínea e contribuindo para a persistência da atividade da molécula nos tecidos alvos e para a meia via longa. Os animais jovens, por apresentarem menor teor de gordura no corpo, tendem a armazenar menor quantidade do composto, influenciando no armazenamento e biotransformação do fármaco.

Em estudos realizados por AntoniĆ *et al.*, (2011) e Ballent *et al.*, (2011), os autores avaliaram a disposição da ivermectina em ovinos após administração subcutânea de 0,2 mg kg⁻¹. AntoniĆ *et al.*, (2011) avaliou ovelhas lactantes da raça Istrian Pramenka, pesando aproximadamente 55,3 ± 5,3 kg e apresentando 3,9 anos ± 1,1 anos e Ballent *et al.*, (2011), ovinos machos da raça Corriedale com peso corpóreo entre 45–50 kg. Os valores de C_{máx} encontrados foram de 13 e 8,8 ng mL⁻¹, respectivamente, semelhantes aos valores obtidos no presente estudo, e T_{máx} de 3,3 e 2,15 dias, respectivamente. O T_{máx} foi superior, indicando uma lenta absorção do fármaco, provavelmente estando relacionada ao tipo de formulação empregado para a administração da droga e a idade do animal. Conforme documentado, a atividade anti-helmíntica dos endectocidas está diretamente relacionada com a quantidade da droga que alcança a circulação sistêmica, sendo este o principal determinante de sua eficácia. A concentração do fármaco no fluido sanguíneo irá depender da dose, da via de administração, da espécie de hospedeiro, do tipo de parasita e do estado fisiológico do animal.

Avaliação dos métodos de controle parasitário em animais em pastagens (Fase II)

O experimento teve como objetivo comparar os resíduos de MOX no soro de cordeiros, terminados sem desmame, submetidos a três métodos de controle de endoparasitas. Foi avaliada a presença de resíduos de MOX no soro no momento de abate, respeitando o tempo de carência de, no mínimo, 28 dias para a coleta das amostras, independente do número de doses aplicadas. Nenhum dos animais apresentou concentração de MOX no soro acima do LOQ do método analítico ($5,0 \text{ ng mL}^{-1}$), indicando que nas condições experimentais do presente estudo não foi verificada diferença entre os métodos de controle parasitário em relação à presença de MOX no soro.

CONCLUSÕES

O método analítico desenvolvido e validado mostrou-se adequado para a identificação e quantificação da MOX em soro de cordeiro.

Os parâmetros farmacocinéticos da MOX, após administração subcutânea de 2 mg kg^{-1} pc, indicaram absorção subcutânea lenta e, portanto, maior exposição sistêmica e menor disponibilidade do fármaco na circulação sanguínea, quando comparado com outras espécies como caprinos, bovinos ou com a ivermectina. Os diferentes métodos de controle parasitários aplicados nos sistemas de produção de cordeiros, quais sejam método preventivo, por contagem de OPG e por avaliação do grau FAMACHA realizados em animais criados em pastagem não apresentaram concentrações de resíduos de MOX no soro superiores ao limite de quantificação do método analítico, no momento do abate.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, M.S.; Sun, T.; McLeory, G. E.; Phillippo, E. T. J. Confirmation of eprinomectin, moxidectin, abamectin, doramectin, and ivermectin in beef liver by liquid chromatography/positive ion atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *AOAC International* **2000**, 83 (1), 39-52.
- Alvinerie, M.; Dupuy, J.; Kiki-Mvouaka, S.; Sutra, J.; Lespine A. Ketoconazole increases the plasma levels of ivermectin in sheep. *Veterinary Parasitology* **2008**, 157 (1-2): 117–122.
- Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase

- Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **2003**, 86 (2), 412-431.
- Antonić, J.; Grabnarb, I.; Cinski, L. M.; Skibina, A.; Süssingera, A.; Cnika, M. P.; Cerkenvenik-Flajsa, V. Influence of P-glycoprotein inhibition on secretion of ivermectin and doramectin by milk in lactating sheep. *Veterinary Parasitology* **2011**, 179 (1-3), 159–166.
- Ballent, M.; Lifschitz, A.; Virkel, Sallovitz, J.; Maté, L.; Lanusse, C. In vivo and ex vivo assessment of the interaction between ivermectin and danofloxacin in sheep. *The Veterinary Journal* **2011**, 192 (3), 422-427.
- Bath, G.F.; Malan, F.; Van Wyk, J.A. The Famacha ovine anemia guide to assist with the control of haemonchosis. In: congress of the livestock health and production, 7., Port Elizabeth, África do Sul. Proceedings...Port Elizabeth: Associação Sul-africana de Medicina Veterinária **1996**, p. 5.
- Bradley, J. M.; Parks, V. Chalon, S.; Gourley, I.; Matschke, K.; Cailleus, K.; Fitoussi, S.; Fleckenstein, L. The Effect of a High-Fat Breakfast on the Pharmacokinetics of Moxidectin in Healthy Male Subjects: A Randomized Phase I Trial. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2012**, 86(1), 122–125.
- Caldas, S. S.; Gonçalves, F. F.; Primel, E. G.; Prestes, O. D.; Martins, M. L.; Zanella, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova* **2011**, 34 (9), 1604-1617
- Chagas, A.C. de S. Resíduos de anti-helmínticos no leite de caprinos. In: Cavalcante, A.C.R.; Vieira, L. da S. et al. Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica **2009**, p. 603.
- Chittrakarn, S.; Janchawee, B.; Ruangrut, P.; Kansanalak, S.; Chethanond, U.; Kobasa, T.; Thammapalo, S. Pharmacokinetics of ivermectin in cats receiving a single subcutaneous dose. *Research in Veterinary Science* **2009**, 86 (3), 503–507.
- Death, C. E.; Taggart, D. A.; Williams, D.; Milne, R.; Schultz, D. J.; Holyoake, C.; Warren, K. S. 2011. Pharmacokinetics of moxidectin in the southern hairy-nosed wombat (*lasiorhinus latifrons*). *Journal of Wildlife Diseases* **2011**, 47(3), 643–649.
- Dupuy, G. Larrieu, J.F. Sutra, A. Lespine, M. Alvinerie. Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. *Veterinary Parasitology* **2003**, 112 (4), 337–347.
- Dupuy, J.; Chartier, C.; Sutra, J.F.; Alvinerie, M.. Eprinomectin in dairy goats: dose influence on plasma levels and excretion in milk. *Parasitology Research* **2001**, 87 (4), 294–298.
- Durden, D. A. Positive and negative electrospray LC–MS–MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. *Journal of Chromatography B* **2006**. 850 (1-2), 134–146.
- EC. European Commission. *Official Journal of the European Communities* 17/08/2002, L221/8-36. **2002**.

- Escudero, E.; Carceles, C.M.; Diaz, M.S.; Sutra, J.F.; Galtier, P.; Alvinerie, M. Pharmacokinetics of moxidectin and doramectin in goats. *Research in Veterinary Science* **1999**, 67 (2), 177–181.
- FAO. Validation of Analytical Methods for Food Control. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Food and Nutrition Paper, no. 68. Joint FAO/IAEA Expert Consultation, Vienna. **1997**. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/w8420e/w8420e00.pdf>>. Acessada em: 25/07/2012.
- FDA. United States Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Department of Health and Human Services. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. **2001**. Disponível em:<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>>. Acessada em: 25/07/2012.
- Giannetti, L.; Giorgi, A.; Necci, F.; Ferretti, G.; Buiarelli, F.; Neri, B. Validation study on avermectine residues in foodstuffs. *Analytica Chimica Acta* **2011**, 700 (1-2), 11–15.
- Gibaldi, M.; Perrier, D. Pharmacokinetics, second ed., revised and expanded. Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque. **1982**.
- Gokbulut, C.; Bilgili, A.; Hanedan, B.; Aksit, D.; Aksoy, A. M.; Turgut, C. Breed-related plasma disposition of ivermectin following subcutaneous administration in Kilis and Damascus goats. *Research in Veterinary Science* **2009**, 87 (3), 445–448.
- Gordon, H. McL.; Whitlock, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research* **1939**, 12, 50-52.
- Hashimoto, J. C.; Paschoal, J.A.R.; Queiroz, S. C. N.; Ferracini, V. L.; Assalin, M. R.; Reyes, F. G. R. A simple method for the determination of malachite Green and leucomalachite Green residues in fish by a modified QuEChERS extraction and LC/MS/MS. *Journal of AOAC International* **2012**, 95 (3), 913-922.
- Hunter, R. P.; Isaza, R.; Koch, D. E.; Dodd, C. C.; Goatly, M. Moxidectin plasma concentrations following topical administration to llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Lama pacos*) *Small Ruminant Research* **2004**, 52 (3), 275–279.
- Inoue, K.; Yoshimi, Y.; Hino, T.; Oka, H. Simultaneous determination of avermectins in bovine tissues by LC-MS/MS. *Journal of Separation Science* **2009**, 32 (21), 3596–3602.
- IUPAC. União Internacional de Química Pura e Aplicada: Compendium of Chemical Terminology – Gold Book. **2002**. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>>. Acessada em: 27/06/2012
- Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K.; Walker, S.; Widmer, M. Quantification of anthelmintic drug residues in milk and muscle tissues by liquid chromatography coupled to Orbitrap and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*. **2011**, 85 (2), 991– 1000.
- Kinsella, B.; Lehotay, S. J.; Mastovskab, K.; Lightfieldb, A. R.; Fureyc, A.; Danahera, M. New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2009**, 637 (1-2), 196–207.

- Lanusse, C., Lifschitz, A., Virkel, G., Alvarez, L., Sanchez, S., Sutra, J.F., Galtier, P., Alvinerie, M. Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *Journal Veterinary Pharmacology* **1997**, 20 (2), 91-99.
- Lifschitz, A.; Virkel, G.; Ballent, M. Sallovitz, J. Lanusse, C. Combined use of ivermectin and triclabendazole in sheep: In vitro and in vivo characterisation of their pharmacological interaction. *The Veterinary Journal* **2009**, 182 (2), 261–268.
- Lifschitz, A.; Virkel, G.; Imperiale, F.; Pis, A.; Lanusse, C. Fármacos endectocidas: avermectinas y milbemicinas. p, 545-558. En: Botana LM, Landoni F, Matín-Jiménez T (eds). *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, España **2002**.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 24. Anexo II: Guia para Validação de Métodos Analíticos e Controle de Qualidade Interna das Análises de Monitoramento do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC. Diário Oficial, nº 138, jul. **2011**.
- Molento M.B. Avanços no diagnóstico e controle das helmintoses em caprinos. I Simpósio Paulista de Caprinocultura (SIMPAC). Multipress, Jaboticabal, **2005**, 101-110.
- Molento, M.B. Resistência Parasitária.. In: Cavalcante, A.C.R.; Vieira, L. da S. et al. *Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. **2009**, p. 603.
- Molento, M. B.; Severo, D. Famacha. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. (Folheto técnico).. **2004**, p. 4.
- Noppe, H.; Verheyden, K.; Bussche, J. V.; Wille, K.; Brabander, H. Detection of macrocyclic lactones in porcine liver, meat and fish tissue using LC–APCI–MS–MS. *Food additives and contaminants* **2009**, 26 (9), 1232-1238.
- Perez, r.; Godoy, C.; Palma, C.; Munoz, L.; Arboix, M.; Alvinerie, M. Plasma disposition and fecal elimination of doramectin after oral or intramuscular administration in horses. *Veterinary Parasitology* **2010**, 170 (1-2), 112–119.
- Prestes, O. D.; Friggi, C. A.; Adaime, M. B.; Zanella, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo para a determinação de multiresíduos de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massa. *Química Nova* **2009**, 32 (6), 1620-1624.
- Rubensam, G.; Barreto, F.; Hoff, R.B.; Kista, T.L.; Pizzolato, T. M. A liquid–liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* **2011**, 705 (1-2), 24–29.
- Sotomaior, C. S.; Carli, L. M.; Tangleica, L.; Kaiber, B. K.; Souza, F. P. Identificação de ovinos e caprinos resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais. *Revista Acadêmica*. Curitiba **2007**, 5 (4), 397-412.
- Stout, S. J.; Wickremesinha, E. ; Cunha, A.R.; Khunachak, A. Confirmation of moxidectin residues in cattle fat by liquid chromatography. *AOAC International* **2000**, 83 (6), 1446-1454.

- Sumano L.H.; Ocampo, C.L. *Farmacología Veterinaria*. 3ra ed. MacGraw-Hill Interamericana, México D.F., México **2006**, 481-482.
- Viana, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no Mundo e no Brasil. *Revista Ovinos*, Porto Alegre **2008**, 4 (12): 1-9.
- Wang, F.; Chen, J.; Cheng, H.; Tang, Z.; Zhang, G.; Niu, Z.; Pang, S.; Wang, X.; Lee, S. C. 2011. Multi-residue method for the confirmation of four avermectin residues in food products of animal origin by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants* **2011**, 28 (5), 627–639.
- Wu, Z.; Li, J.; Zhu, L.; Luo, H.; Xu, X. Multi-residue analysis of avermectins in swine liver by immunoaffinity extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal Chromatography B Biomedical Sciences Applications* **2001**, 755 (1), 361-366.
- Xia, X.; Dong, Y.; Luo, P.; Wang, X.; Li, X.; Ding, S.; Shen, J. Determination of benzimidazole residues in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2010**, 878 (30), 3174–3180.

CONCLUSÕES GERAIS

A ovinocultura vem despertando enorme interesse em todas as regiões do Brasil em virtude da alta demanda pela produção de carne. Em função da importância de se manter a produção constante e com boa qualidade do produto, e devido aos modelos produtivos na ovinocultura basearem-se em sistemas de produção em pastagens, onde os animais podem ser frequentemente infectados por parasitas gastrointestinais, a utilização de antiparasitários tem sido largamente empregada.

Com o uso indiscriminado e abusivo dos medicamentos antihelmínticos destacam-se duas problemáticas: o desenvolvimento de resistência dos parasitas à ação dos antihelmínticos e a presença de resíduos destes compostos no produto final.

Como medida de controle da resistência dos parasitos aos medicamentos existentes no mercado, e também visando minimizar a proliferação de enfermidades entre os animais, algumas alternativas de manejo e produção vêm sendo estudadas, entre as quais se podem citar: o manejo dos rebanhos e da pastagem, adequada nutrição em função das diferentes categorias, seleção de animais resistentes, controle biológico, utilização de vacinas, fitoterapia e/ou a utilização de técnicas para avaliação do grau de infecção dos animais, de forma a garantir que os procedimentos de controle sejam efetivos (tratamento seletivo).

Dentre as técnicas para avaliação do grau de carga parasitária dos ovinos destacam-se o exame do grau FAMACHA® e a contagem de ovos por grama de fezes (OPG). O método FAMACHA® trabalha com a premissa de apenas tratar os animais altamente parasitados, identificando aqueles capazes de suportar uma infecção por *H. contortus*, por meio da coloração da membrana conjuntiva. A contagem de OPG busca administrar o fármaco para os animais que possuem alta contagem de ovos presentes nas fezes. Alternativa que tem sido empregada na prática, por muito tempo, é administrar o fármaco em tempos regulares, a fim de inibir infecções clínicas e/ou subclínicas, o que leva inclusive à aplicação do medicamento em animais que não estão parasitados, aumentando o custo com o tratamento e podendo ocasionar a resistência parasitária.

O estudo farmacocinético fornece informações indispensáveis para uma maior segurança sobre a utilização dos produtos veterinários nos sistemas de produção, obtendo-se assim, as melhores taxas de erradicação parasitária com os menores níveis de resistência.

Para tanto, é importante salientar a necessidade do desenvolvimento e validação de métodos analíticos, que possibilitem esses estudos. O emprego da técnica por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas apresenta vantagens como a seletividade e a possibilidade de confirmação da identidade dos analitos, aumentando, assim, a confiabilidade dos resultados.

Assim, no presente trabalho, Um método simples e rápido empregando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS) foi desenvolvido para a determinação de resíduos de MOX em soro de cordeiro. O método desenvolvido teve o procedimento de preparo de amostra simplificado, pela utilização da extração em ACN, seguida por uma etapa de purificação dos extratos com o auxílio dos adsorventes PSA e C18.

O método analítico foi validado conforme os Guias de Validação da Comunidade Europeia (EC, 2002) e do MAPA (BRASIL, 2011), garantindo a confiabilidade e segurança dos parâmetros determinados. O método por LC-MS/MS desenvolvido mostrou-se adequado para identificação e quantificação da MOX em soro de cordeiro.

O método foi validado e aplicado na análise de amostras de soro de cordeiro da raça suffolk, provenientes da Fazenda Experimental de Ovinos e Caprinos da UFPR, Curitiba, Brasil. A disposição da MOX no soro de cordeiros (n=7) foi avaliada após administração subcutânea de 0,2 mg kg⁻¹ de peso corpóreo, em uma única dose. As concentrações de MOX no soro apresentaram valores de C_{máx} 8,5 ± 2,81 ng mL⁻¹, no T_{máx} de 1 dias. O valor da AUC foi de 82,42 ± 8,02 ng/dia/mL. O T_{1/2} obtido foi de 7,66 ± 1,62 dias.

Os diferentes tratamentos antiparasitários: preventivo, OPG e FAMACHA realizados em animais de pastagem não apresentaram diferenças em relação a presença da MOX no soro dos animais. Na época do abate (136 dias de idade) não foi verificada a presença de MOX no soro dos animais (n=40), em níveis acima do LOQ, o que indica que nas condições experimentais utilizadas no presente estudo não houve diferença entre os métodos de controle parasitário avaliados, quanto a presença de MOX no soro.

ANEXO



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 055/2011, referente ao projeto “Resíduo de Moxidectina nos tecidos de cordeiros terminados em pasto submetidos a três programas de controle de endoparasitas e seu impacto no ambiente”, sob a responsabilidade de Alda Lucia Gomes Monteiro, na forma que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 16 de dezembro de 2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 055/2011, regarding the project “Moxidectin residue in tissues of lambs finishing on pasture in three endoparasites control programs and its impact on the environment”, in charge of Alda Lucia Gomes Monteiro, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on December 2011.

Curitiba, 16 de dezembro de 2011.

Geraldo Camilo Alberton
Presidente

Patrick Schmidt
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná.