CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS FARMACOLÓGICOS (ALBENDAZOLE E IVERMECTINA) EM LEITE DE CABRAS NATIVAS CRIADAS NA CAATINGA

PATRÍCIA SILVA SANTOS

2013

PATRÍCIA SILVA SANTOS

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS FARMACOLÓGICOS (ALBENDAZOLE E IVERMECTINA) EM LEITE DE CABRAS NATIVAS CRIADAS NA CAATINGA

Tese apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração em Produção de Ruminantes, para obtenção do título de **Doutora em Zootecnia**.

Orientador:
Prof. *D.Sc.* Jurandir Ferreira da Cruz

Co-Orientador:
Prof. *D.Sc.* José Soares dos Santos

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
2013

S237c Santos, Patrícia Silva.
Caracterização físico-química e determinação de resíduos farmacológicos (albendazole e ivermectina) em leite de cabras nativas criadas na caatinga, 2013.
98f.: il.; algumas color.
Orientador (a): Jurandir Ferreira da Cruz.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Itapetinga, 2013.
Inclui Referências.
1. Leite caprino – Composição. 2. Cabras nativas (Caatinga) – Lactação. I. Cruz, Jurandir Ferreira. II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III.T.

CDD: 636.39

Catalogação na fonte:
Elinei Carvalho Santana - CRB/1026
Bibliotecária – UESB – Campus Vitória da Conquista-BA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Área de Concentração: Produção de Ruminantes

Campus Itapetinga-*BA*

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: "Caracterização físico-química e determinação de resíduos farmacológicos (albendazole e ivermectina) em leite de cabras nativas criadas na caatinga".

Autor (a): Patrícia Silva Santos
Orientador (a): Prof. Dr. Jurandir Ferreira da Silva
Co-orientador (a): Prof. Dr. José Soares dos Santos

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PRODUÇÃO DE RUMINANTES, pela Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jurandir Ferreira da Cruz - UESB

Prof. Dr. José Soares dos Santos – UESB

Profª. Drª. Maria Lúcia Pires dos Santos – UESB

Profª. Drª. Mara Lúcia Albuquerque Pereira - UESB

Prof. Dr. Laudi Cunha Leite – UFRB

Data de realização: 17 de abril de 2013.

Ao meu irmão (*in memoriam*), por todos os momentos que me fez sorrir, e à minha mãe, por ter me ensinado a sorrir mesmo em meio às adversidades.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, a razão da minha existência, por todas as bênçãos concedidas e por estar comigo em todos os momentos, guiando-me, protegendo-me, dando-me forças, coragem e serenidade;

À minha família, a minha base sólida. Ao meu pai Adauto e ao meu irmão Wellington (*in memoriam*), à minha mãe Maria José e à minha irmã Kátia, duas mulheres maravilhosas que me deram exemplo de coragem, força e persistência e me ensinaram quatro palavras mágicas: desejar, agir, acreditar e realizar. Aos meus sobrinhos Gabriel e Maria Eduarda, por "pintarem o sete, o oito, o nove" e tornarem a minha vida mais colorida;

Ao meu companheiro, amigo, esposo amado, João Alberto, pelo incentivo, apoio, por ter compreendido minha ausência em tantos momentos;

Ao meu orientador Jurandir Ferreira da Cruz, pela dedicação, comprometimento durante a orientação, apoio, amizade e por desejar e fazer sempre o melhor;

Ao meu co-orientador José Soares dos Santos, pela orientação constante, pela confiança, respeito e incentivo, dizendo nos momentos mais complicados que tudo daria certo;

À professora Maria Lúcia Pires dos Santos, pelo apoio e incentivo;

À Alana e Lenilson, essas duas grandes pessoas que tive oportunidade de conhecer e conviver, pelo auxílio constante nas análises laboratoriais, dedicação, carinho, amizade e apoio em todos os momentos;

Ao Sr. Leonardo Teixeira, proprietário da Fazenda Várzea Comprida, por ter permitido a realização em sua propriedade, de todas as etapas de campo desta pesquisa, nos recebendo sempre com atenção e amizade;

A Carlito e Maxwell, funcionários da Fazenda Várzea Comprida, pelo auxílio e ded
na realização dos experimentos, e à Cida, pelo apoio e amizade.

À Cleia, amiga irmã, por tudo que vivemos, pelo conforto nos momentos de angústia e pelas risadas nas horas de descontração;

Aos meus colegas de curso e grandes amigos que ganhei nesta caminhada: Rosimira Amaral e Fábio Martins;

À equipe do Laboratório de Química Analítica e Ambiental, que me acolheu com tanto carinho, apoiou e incentivou;

Ao colega Milton, pelo valioso auxílio nas análises estatísticas;

À equipe do setor de Caprinos e Ovinos, Mateus, Ana Cláudia, Helder, Emanuelly, Fabrine, Luiz, Dalmar, Gilmar e Claudionor, pela amizade e auxílio constante;

Ao Laboratório de Análise de Água e Alimentos, em especial, à Professora Roseane Mendonça, pelo apoio constante;

À equipe do Laboratório de Nutrição Animal, pelo auxílio constante;

À colega de curso, Edileusa, por ter me acolhido em sua casa, pelo apoio, amizade e auxílio no preparo das amostras;

Ao Centro de Apoio a Análises Cromatográficas, em especial, às Professoras Débora Andrade e Juliana Simionato, à doutoranda Ellen Lacerda e à mestranda Jeany Damásio;

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

Àqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho;

Sei que muitos torceram, oraram, rezaram, fizeram preces para que eu chegasse até aqui.

Obrigada!

RESUMO

SANTOS, P. S. **Caracterização físico-química e determinação de resíduos farmacológicos (albendazole e ivermectina) em leite de cabras nativas criadas na caatinga.** Itapetinga-BA: UESB, 2013. 98p. (Tese - Doutorado em Zootecnia - Área de concentração em Produção de Ruminantes)*

Este estudo teve como objetivo caracterizar os parâmetros físico-químicos e determinar a excreção da ivermectina e do albendazole no leite de cabras nativas criadas em sistema extensivo na Caatinga. O estudo foi composto de três experimentos. No estudo I, foram verificadas variações ($P<0,05$) nos parâmetros físico-químicos do leite ao longo da lactação, com acidez variando de 15,5 a 18,4°D; densidade de 1025,6 a 1033,1 g L^{-1}; gordura de 2,5% a 3,7%; extrato seco total de 10,1% a 12,4%; extrato seco desengordurado de 7,2 a 9,2%; lactose de 4,3 a 4,7% e proteína de 3,0 a 3,4%. Houve predominância de ácidos graxos saturados, em uma proporção média de 78:20:2, para ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, respectivamente, ao longo da lactação. Nos experimentos II e III, verificou-se que o método de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV/VIS foi eficaz para detecção e quantificação de resíduos dos dois fármacos analisados. A excreção do resíduo de ivermectina ocorreu de forma diferenciada em função do tempo. No período entre o dia 3 e o dia 21, as concentrações médias de ivermectina foram semelhantes, quando todas as amostras apresentaram valores ≥51,90 μg mL^{-1}. No período entre o D_{28} e $D_{42,}$ as concentrações médias de ivermectina decresceram de forma gradual. No D_{28}, 33,3% das amostras apresentaram valores <0,92 μg mL^{-1} e 66,6% apresentaram valores ≥51,40 μg mL^{-1}. No D_{35}, embora em 50% das amostras não tenha sido detectado resíduo, nas demais amostras foram encontrados resíduos em concentrações ≥45,93 μg mL^{-1}. No $D_{42,}$ em nenhuma amostra foi detectado resíduo de ivermectina. As concentrações médias de albendazole no leite decresceram de forma gradual no período avaliado, sendo que 72 horas após administração, embora em 50% das amostras não tenha sido detectado resíduo, nas demais amostras foram encontrados resíduos em concentrações ≥47,61 μg mL^{-1}, porém, em nenhuma amostra foi detectado resíduo de albendazole 96 horas após sua administração. Conclui-se que os aspectos físico-químicos do leite de cabras nativas criadas em sistema extensivo na Caatinga apresentam variações expressivas ao longo da lactação e que o leite de cabras tratadas com albendazole ou ivemectina, via oral, apresenta resíduos em concentrações inferiores ao limite máximo aceitável estabelecido pelos órgãos nacionais e internacionais de saúde, sendo abaixo de 1,28 μg mL^{-1} as 96 horas após o tratamento, no caso do albendazole, e de 0,92 μg mL^{-1} aos 42 dias com o uso da ivermectina, podendo tecnicamente ser indicado ao consumo humano, decorrido o período descrito após o tratamento.

Palavras-chave: ácidos graxos, benzimidazóis, CLAE, composição do leite, lactona macrocíclica, leite caprino, resíduo.

---

* Orientador: Jurandir Ferreira da Cruz, *D.Sc.*, UESB e Co-orientador: José Soares dos Santos, *D.Sc.*, UESB

ABSTRACT

SANTOS, P. S. **Physical-chemical characterization and determination of pharmacological residues (albendazole and ivermectin) in the milk from native goats raised in the Caatinga.** Itapetinga-BA: UESB, 2013. 98p. (Thesis – Doctorate in Animal Science – Concentration Area in Ruminants' Production) †

This study aimed to characterize the physical-chemical parameters and to determine the excretion of ivermectin and albendazole in the milk from native goats raised in an extensive system in the Caatinga. The study consisted of three experiments. In study I, changes were observed ($P<0.05$) in the physical-chemical parameters of the milk over the lactation period, with acidity ranging from 15.5 to 18.4°D; density from 1025.6 to 1033.1 g L^{-1}; fat from 2.5% to 3.7%; total dry extract from 10.1% to 12.4%; defatted dry extract from 7.2 to 9.2%; lactose from 4.3 to 4.7%; and protein from 3.0 to 3.4%. There was predominance of saturated fatty acids in an average ratio of 78:20:2, for saturated fatty, monounsaturated and polyunsaturated acids, respectively, over the lactation period. In experiments II and III, it was found that the method of high-performance liquid chromatography provided with a UV/VIS detector was effective for detecting and quantifying the residues of the two analyzed drugs. The excretion of ivermectin residue took place differently due to time. In the period between the 3rd day and the 21st day, the average concentrations of ivermectin were similar, when all samples showed values ≥51.90 μg mL^{-1}. In the period between D_{28} and D_{42}, the average concentrations of ivermectin decreased gradually. In D_{28}, 33.3% of the samples showed values <0,92 μg mL^{-1} and 66.6% showed values ≥51.40 μg mL^{-1}. In D_{35}, although in 50% of the samples no residues have been detected, in the other samples residues were found at concentrations ≥45.93 μg mL^{-1}. In D_{42}, ivermectin residue was not detected in any sample. The average concentrations of albendazole in the milk decreased gradually over the assessed period, and 72 hours after administration, although in 50% of the samples no residues have been detected, in the other samples residues were found at concentrations ≥47.61 μg mL^{-1}, however, in any sample albendazole residue was not detected 96 hours after its administration. One concludes that the physical-chemical aspects of the milk from native goats raised in an extensive system in the Caatinga show significant variations over the lactation period and that the milk from goats treated with orally administered albendazole or ivermectin presents residues at concentrations below the maximum acceptable limit established by the national and the international health organizations, with less than 1.28 μg mL^{-1} 96 hours after the treatment, in the case of albendazole, and 0.92 μg mL^{-1} 42 days with the use of ivermectin, which may technically be suitable for human consumption, when the period described after the treatment is elapsed.

Keywords: fatty acids, benzimidazoles, HPLC, milk composition, macrocyclic lactone, goat milk, residue.

---

† Adviser: Jurandir Ferreira da Cruz, *D.Sc*., UESB and Co-adviser: José Soares dos Santos, *D.Sc*., UESB

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 Parâmetros físico-químicos do leite de cabras nativas criadas em sistema extensivo na Caatinga..... 52
Tabela 2 Correlações entre os parâmetros físico-químicos do leite de cabras nativas criadas em sistema extensivo na Caatinga..... 54
Tabela 3 Concentrações (%) dos ácidos graxos presentes no leite de cabras nativas criadas em sistema extensivo na Caatinga, em diferentes momentos de lactação..... 56

CAPÍTULO II

Tabela 1 Taxas de recuperação, repetibilidade e reprodutibilidade parcial do método analítico utilizado para detecção da ivermectina em leite caprino..... 73
Tabela 2 Resíduos de ivermectina encontradas no leite de cabras nativas no período de 42 dias após aplicação do fármaco..... 75

CAPÍTULO III

Tabela 1 Taxas de recuperação, repetibilidade e reprodutibilidade parcial do método analítico utilizado para detecção do analito albendazole em leite caprino..... 90
Tabela 2 Resíduos de albendazole encontradas no leite de cabras nativas nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas após aplicação do fármaco..... 92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura e fórmulas das avermectinas..... 22
Figura 2 Estutura do albendazole..... 24
Figura 3 Etapas envolvidas na SPE: condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito..... 28

CAPÍTULO II

Figura 1 Curva analítica obtida por CLAE/UV com leite caprino contendo diferentes concentrações de ivermectina..... 71
Figura 2 Cromatogramas obtidos com a solução padrão de ivermectina (a) e com amostras de leite de cabras contendo resíduos de ivermectina (b) com os respectivos tempos de retenção (TR)..... 72
Figura 3 Curva de concentração do resíduo de ivemectina no leite de cabras nativas tratadas..... 74

CAPÍTULO III

Figura 1 Curva analítica obtida por CLAE/UV com leite caprino contendo diferentes concentrações de albendazole..... 88
Figura 2 Cromatogramas obtidos com a solução padrão de albendazole (a) e com amostras de leite de cabras contendo resíduos de albendazole (b) com os respectivos tempos de retenção (TR)..... 89
Figura 3 Curva de concentração do resíduo de albendazole no leite de cabras nativas tratadas..... 91

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CE	Comunidade Europeia
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
D_0	Dia zero
D_n	Dia (sendo n o número de dias após aplicação do fármaco)
EP	Erro padrão
ESD	Extrato seco desengordurado
EST	Extrato seco total
g	Grama
kg	Quilogramas
L	Litro
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
mg	Miligramas
mL	Militro
µg	Microgramas
SRD	Sem raça definida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 14

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 16
2.1 Leite de cabra: características físico-químicas e aspectos legais..... 16
2.2 Composição lipídica do leite de cabra..... 18
2.3 Biossíntese dos componentes do leite..... 19
2.4 Resíduos em leite..... 20
2.4.1 Avermectinas..... 21
2.4.2 Benzimidazóis..... 24
2.5 Métodos cromatográficos de análises do leite..... 25
2.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência para análise de resíduos de fármacos..... 25
2.5.1.1 Preparo de amostras para determinação de resíduos por cromatográfica líquida de alta eficiência..... 26
2.5.2 Cromatografia gasosa para análise de ácidos graxos em leite..... 29
2.6 Validação do método analítico para determinação de resíduos farmacológicos no leite caprino..... 30
REFERÊNCIAS..... 36

3 CAPÍTULO I: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO LEITE DE CABRAS NATIVAS CRIADAS EM SISTEMA EXTENSIVO NA CAATINGA..... 45
RESUMO..... 45
ABSTRACT..... 46
3.1 INTRODUÇÃO..... 47
3.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 48
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 51
3.4 CONCLUSÕES..... 59
REFERÊNCIAS..... 60

4 CAPÍTULO II: EXCREÇÃO DE IVERMECTINA NO LEITE DE CABRAS NATIVAS..... 64
RESUMO..... 64
ABSTRACT..... 65
4.1 INTRODUÇÃO..... 66
4.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 68
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 71
4.4 CONCLUSÕES..... 77
REFERÊNCIAS..... 78

5 CAPÍTULO III: EXCREÇÃO DE ALBENDAZOLE NO LEITE DE CABRAS NATIVAS..... 81
RESUMO..... 81
ABSTRACT..... 82
5.1 INTRODUÇÃO..... 83
5.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 85
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 88
5.4 CONCLUSÕES..... 94
REFERÊNCIAS..... 95

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 98

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura na região nordeste constitui-se, em muitos casos, como única fonte de renda para grande parte de pequenos produtores rurais, além de contribuir de forma significativa para a redução do déficit nutricional destas comunidades, uma vez que a carne e o leite são importantes fontes de proteína animal.

A elevada prevalência de endoparasitoses, no entanto, tem sido uma limitação à produção de caprinos. A despeito da modernização do sistema de produção, o controle dos endoparasitas ainda vem sendo realizado, basicamente, por meio do uso de drogas anti-helmínticas, dentre as quais, as avermectinas e os benzimidazóis têm sido as mais utilizadas.

O uso de drogas anti-helmínticas, apesar de ser útil no controle das endoparasitoses, apresenta algumas limitações. Algumas não são indicadas para uso em animais lactantes e outras só podem ser utilizadas se for respeitar o período de carência recomendado pelo fabricante, uma vez que a glândula mamária funciona também como órgão excretor de metabólitos.

A eliminação de resíduos farmacológicos e de seus metabólitos através do leite pode apresentar efeitos negativos à saúde humana, pois além de poder desencadear o fenômeno da resistência parasitária, os fármacos utilizados podem apresentar efeitos genotóxicos e/ou teratogênicos (EMEA, 2004).

O uso da cromatografia gasosa (CG) ou líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido comum em estudos relacionados à caracterização das propriedades físico-químicas, perfil lipídico ou determinação de resíduos farmacológicos na matriz leite bovino, sendo poucos os estudos com leite caprino.

As propriedades físico-químicas do leite caprino vêm sendo estudadas em muitos países com a finalidade de assegurar à qualidade e aceitação de um produto composto de substâncias benéficas a saúde humana. O leite caprino tem sido indicado no tratamento de desordens clínicas como síndromes de má absorção e a desnutrição infantil por apresentar digestibilidade elevada (PARK et al., 2007), além de possibilitar, devido às maiores concentrações dos ácidos graxos caproico, caprílico e cáprico, o fornecimento direto de energia ao organismo sem acúmulo no tecido adiposo (HAENLEIN, 2004). No entanto, apesar dessas vantagens, ainda existem lacunas de informações quanto a sua composição

química, a qual pode ser influenciada por fatores como o grupo genético (QUEIROGA et al., 2007) e a alimentação (MORAND-FEHR, 2005).

A despeito da recomendação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, que o leite deve ser o alimento prioritário nos estudos voltados para saúde pública, informações sobre a presença de resíduos no leite caprino são ainda escassas, e no caso de leite de cabras nativas são inexistentes, ainda que esse grupo genético seja a maioria absoluta dos caprinos do Brasil. Por outro lado, a Instrução normativa 37 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que regulamenta a produção, processamento e define os parâmetros físico-químicos do leite caprino, foi baseada em estudos com animais de raças leiteiras exóticas (BRASIL, 2000).

Nesse sentido, buscando contribuir com informações estratégicas para definição de normas para produção e comercialização do leite caprino no Brasil, foram realizados três estudos. No estudo I, foram determinadas as características físico-químicas e o perfil lipídico do leite de cabras nativas criadas em sistema extensivo na Caatinga; e nos estudos II e III, foram desenvolvidos e validados dois métodos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV/VIS para determinação de resíduos da ivermectina e albendazole em amostras de leite de cabra, bem como determinado os perfis de excreção desses dois fármacos no leite de cabras nativas submetidas ao controle parasitário.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leite de cabra: características físico-químicas e aspectos legais

A produção mundial de leite caprino atingiu em 2005 aproximadamente 12,5 milhões de toneladas, no entanto, menos de 5% deste total foi comercializado (FAO, 2006). Enquanto que no Brasil, a produção anual de leite de cabra foi de 135 milhões de litros (FAO, 2011), o que corresponde a apenas 0,5% do total de leite produzido no Brasil, considerando as espécies bovina, caprina e ovina (MEDEIROS et al., 2011).

A maior parte do leite de cabra produzido no mundo é utilizado no consumo doméstico das famílias (autoconsumo), vendido para a vizinhança ou usado na alimentação das crianças (DUBEUF, 2005), este fato não é diferente em países em desenvolvimento (JACOPINI et al., 2011).

No Brasil, os estados da região Nordeste, Sul e Sudeste são os maiores produtores de leite de cabra (MEDEIROS et al., 2011). A região Nordeste, com cerca de 10 milhões de cabeças (FAO, 2011), concentra o maior rebanho caprino do País, sendo que as maiores produções de leite de cabra são obtidas nos estados da Paraíba e do Rio Grande do Norte com 18.000 e 10.000 litros de leite/dia, respectivamente (MEDEIROS et al., 2011).

Tendo em vista o cenário nacional do mercado de leite caprino, é fundamental que os produtores assegurem a qualidade, controlando o volume produzido e a composição do leite, aperfeiçoando a higiene durante a ordenha e a saúde do rebanho (WANDER; MARTINS, 2008).

O leite de cabra, segundo o Decreto n° 9.525 de 15 de dezembro de 1986, é denominado como normal, fresco, integral, oriundo da ordenha completa e ininterrupta de cabras sadias, que apresente as características normais; teor de gordura mínimo de 3%, acidez em graus Dornic entre 13 e 20, extrato seco total mínimo de 11,7% e densidade (a 15°C) entre 1.028 a 1.031 g L^{-1} (BRASIL, 1986).

Por outro lado, a despeito da existência do Decreto 9.525, até a década de 90 o leite de cabra era analisado com base na legislação para leite de vaca na maior parte do país. No ano 2000, entrou em vigor a legislação federal própria para leite de cabra (Instrução Normativa n° 37), a qual define os procedimentos da produção ao processamento, bem como determina os padrões físico-químicos e microbiológicos estabelecidos pelo

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), para o leite cru, pasteurizado e esterilizado (BRASIL, 2000).

A caracterização físico-química do leite de cabra abrange, entre outras análises, determinação da densidade, acidez titulável, teor de gordura, extrato seco total e desengordurado, lactose e proteína (MENDES et al., 2009).

A densidade é o peso específico do leite, cujo resultado depende da concentração de elementos em solução e da porcentagem de gordura (FONSECA; SANTOS, 2001; MENDES et al., 2009). Alguns estudos têm mostrado que podem ser observadas variações individuais, com valores para densidade entre 1.026 a 1.042 g L^{-1} (RIBEIRO; RIBEIRO, 2001), ou entre 1.024 e 1.036 g L^{-1} (FONSECA; SANTOS, 2001). De acordo com a IN-37, os valores mínimo e máximo admitidos para o leite de cabra são 1.028 e 1.034 g L^{-1}, respectivamente (BRASIL, 2000).

O leite de cabra apresenta uma acidez natural de 14° Dornic ou pH 6,4 (RIBEIRO; RIBEIRO, 2001). O teste Dornic tem sido preferido para a avaliação de acidez do leite por detectar aumentos na concentração de ácido lático. Entretanto, outros componentes do leite como os citratos, fosfatos e proteínas podem interferir nesse parâmetro, possibilitando a ocorrência de resultados variáveis, entre 10º e 30ºD (FONSECA; SANTOS, 2001). A IN-37 estabelece para o leite de cabra valores mínimos e máximos de 13 e 18ºD, respectivamente (BRASIL, 2000).

A gordura presente no leite encontra-se sob a forma de glóbulos, que ficam suspensos como uma emulsão (RIBEIRO; RIBEIRO, 2001). No leite caprino, 65% dos glóbulos de gordura apresentam diâmetro de 3,0 μm (CENACHI et al., 2011). Parece consenso que a gordura é o componente do leite que mais sofre influência da alimentação, raça, estação do ano e período de lactação (SILVA, 1997; COULON; PRIOLO, 2002), sendo encontrados resultados entre 4,6 a 5,5% (QUEIROGA et al., 1998) com valores médios de 3,4%, (QUEIROGA et al., 2007) e 4,1% (GOMES et al., 2004). A despeito da potencial variabilidade, a IN-37 define 2,9% como o limite mínimo de gordura no leite de cabra (BRASIL, 2000).

A quantidade de sólidos totais (proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e vitaminas) está diretamente relacionada ao rendimento da produção de derivados do leite como o queijo (COSTA et al., 2008). Estudos têm mostrado valores médios de 11,4% e 7,99% (QUEIROGA et al., 2007), 12,16% e 8,5% (STRZAŁKOWSKA et al., 2009) para extrato seco total e desengordurado, respectivamente. O parâmetro EST está

correlacionado com o teor de gordura e a densidade do leite. O extrato seco desengordurado compreende todos os seus componentes, exceto a água e a gordura, por isso está altamente correlacionado com as porcentagens de gordura e de EST. A IN-37 somente estabelece que o valor mínimo do ESD deve ser de 8,2%.

Dentre os carboidratos presentes no leite caprino, a lactose é considerado como principal, quando comparada aos oligossacarídeos, glicopeptídeos, glicoproteínas e açúcares nucleotídeos (CENACHI et al., 2011). A lactose é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose (α ou β) e uma de galactose (β) (MENDES et al., 2009), cuja quantidade mínima admitida pela IN-37 é 4,3% (BRASIL, 2000).

As principais proteínas do leite de cabra são as mesmas dos leites de outras espécies, caseínas (κ-, β-, α_{s1}-, α_{s2}- e γ-caseína) e soro-proteínas, β-lactoglobulina, α-lactoalbumina, albumina do soro bovino e imunoglobulinas (CENACHI et al., 2011). A IN-37 determina que a quantidade de proteína total do leite de cabra deve ser no mínimo de 2,8% (BRASIL, 2000).

Em relação à proteína α_s-caseína, o leite de cabra apresenta maiores proporções de α_{s2} do que α_{s1}- caseína. A α_{s1}-caseína tem sido apontada como responsável pelo aparecimento de reações alérgicas em algumas pessoas após consumo do leite de vaca, que diferentemente do leite caprino apresenta grandes proporções desta fração proteica (MENDES et al., 2009). A diferença existente na quantidade e composição de aminoácidos desta fração proteica no leite dessas espécies faz com que o leite caprino seja comumente utilizado como substituto ao leite de vaca (HAENLEIN, 2004).

2.2 Composição lipídica do leite de cabra

Os ácidos graxos do leite caprino são sintetizados nos alvéolos da glândula mamária, por meio da atividade enzimática com a participação da acetil CoA carboxilase e da ácido graxo sintase, que, em ruminantes, utilizam o acetato como principal precursor lipogênico. A acetil CoA carboxilase é responsável pela formação do malonil-CoA, a partir do acetato e a ácido graxo sintase catalisa a condensação do malonil-CoA com acetil-CoA ou butiril-CoA a partir do β-hidroxibutirato (CHILLIARD et al., 2001).

O leite caprino possui elevados teores de ácidos graxos de cadeia curta e média, tais como o ácido butírico (C4:0), caproico (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), láurico (C12:0) e mirístico (C14:0). Os ácidos caproico, caprílico e cáprico constituem cerca de

15% a 20% de todos os ácidos graxos no leite de cabra (BOZA; SANZ SAMPELAYO, 1997; CHILLIARD et al., 2006; CENACHI et al., 2011).

A maior proporção dos ácidos graxos de cadeia curta e média confere ao leite caprino maior velocidade de digestão, uma vez que seu baixo peso molecular e hidrosolubilidade facilitam a ação das enzimas digestivas, como as lipases nas ligações éster dos triglicerídeos, fazendo com que a hidrólise ocorra de forma mais rápida e completa, quando comparada ao que ocorre com os ácidos graxos de cadeia longa (LÓPEZ-ALIAGA et al., 2000; SANZ SAMPELAYO et al., 2007).

Os ácidos linoleicos conjugados (CLA), predominantes no leite de ruminantes (PRANDINI et al., 2007), são os mais estudados no que se refere à nutrição e impacto sobre a composição dos produtos. Esses ácidos graxos são os que apresentam maior potencial funcional e de manipulação por meio da nutrição (BONFIM et al., 2008).

2.3 Biossíntese dos componentes do leite

A secreção do leite é resultante da síntese nas células epiteliais e sua passagem do citoplasma das células para o lúmen alveolar demanda enorme atividade metabólica (VENTURINI et al., 2007). Em uma cabra leiteira é requerida a passagem de aproximadamente 45 litros de sangue pela glândula mamária para produzir um litro de leite (GONZÁLEZ, 2006).

O processamento inicia-se na boca pela mastigação e pela atuação de enzimas. O material mastigado passa ao rúmen, onde sofre a ação de microrganismos, dentre eles bactérias e protozoários responsáveis pela fermentação contínua do alimento ingerido. Os produtos resultantes do metabolismo fermentativo, tais como aminoácidos, carboidratos e gorduras, após serem absorvidos no trato gastrointestinal, são transportados pela corrente sanguínea até a glândula mamária, onde são utilizados na síntese do leite (VENTURINI et al., 2007).

A glicose da dieta é totalmente fermentada no rúmen, onde é transformada em ácidos graxos voláteis (ácido acético, propiônico e butírico). No entanto, devido à grande demanda do úbere lactante pela glicose, o fígado transforma o ácido propiônico novamente em glicose, a qual é transportada pelo sangue para o úbere, onde é usada pelas células secretórias como o bloco construtor de galactose e, subsequentemente, lactose, ou de glicerol, necessário para síntese de gordura (WATTIAUX, 2009).

Para a formação da molécula de lactose, ocorre a ligação entre a molécula de glicose e outra de galactose, que é feita pela enzima lactose sintetase. A secreção de lactose dentro do lúmen alveolar causa entrada de água, exercendo importante controle do volume do leite. Cada micrograma de lactose do leite arrasta aproximadamente 10 vezes o peso em água (FONSECA; SANTOS, 2001), constituindo-se no principal componente osmótico do leite (GONZÁLEZ et al., 2001; QUEIROGA et al., 2007).

A síntese de proteína nas células secretoras ocorre no retículo endoplasmático rugoso, cuja estrutura é predeterminada pela informação genética contida no DNA, o qual funciona como um molde para a síntese de uma fita de RNA, que será decodificada pelos ribossomos (FONSECA; SANTOS, 2001). As proteínas do leite (exceto soroalbumina e imunoglobulinas) são sintetizadas por células epiteliais na glândula mamária a partir dos aminoácidos extraídos do sangue (GONZÁLEZ et al., 2001).

Acetato e butirato produzidos no rúmen são usados em parte como blocos construtores de cadeia curta de ácidos graxos encontrados no leite. O glicerol necessário para unir 3 ácidos graxos em um triglicerídeo vem da glicose. Cerca de 17-45% da gordura do leite é construída de acetato e 8-25% de butirato. A composição da dieta tem uma forte influência na concentração da gordura do leite (WATTIAUX, 2009).

As vitaminas são compostos essenciais que são requeridos na dieta. A maioria das vitaminas hidrossolúveis (complexo B) é sintetizada pelos microrganismos do rúmen e, dessa forma, os níveis de vitaminas no leite refletem os níveis presentes no sangue. As vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) estão associadas com os glóbulos de gordura (FONSECA; SANTOS, 2001).

Embora o leite contenha vários minerais sob o ponto de vista nutritivo, os mais importantes secretados no leite, envolvidos no crescimento dos ossos, são o cálcio e o fósforo (FONSECA; SANTOS, 2001).

2.4 Resíduos no leite

Com o avanço tecnológico da caprinocultura, tornou-se comum também a presença de substâncias estranhas no leite, que podem ter efeitos nocivos à saúde humana. O leite pode se tornar veículo para diversas substâncias como conservantes, adulterantes, antimicrobianos (SIQUEIRA, 2007) e anti-helmínticos (BRANDON et al., 2002; TURNIPSEED et al., 2005; SOUZA et al., 2007).

Os resíduos totais de um fármaco em tecidos de origem animal estão constituídos pelos produtos originais e seus metabólitos ou derivados farmacológicos, que permanecem no alimento depois da administração do fármaco aos animais (FAO/WHO, 1989).

Ciente que a qualidade do leite de cabra é influenciada, principalmente, pelo estado sanitário do rebanho e pelo manejo, e, que a demanda pela qualidade vem aumentando gradualmente, é necessário que medidas práticas de higiene sejam adotadas para a obtenção do mesmo, assim como, que métodos laboratoriais avaliem objetivamente essa qualidade (SOUZA, 2003a; SIQUEIRA, 2007).

Com o objetivo de avaliar e prevenir esses riscos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária implantou no Brasil, em 2003, o programa de análise de resíduos em alimentos de origem animal (PAMVET), que visa controlar resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos, propor o estabelecimento dos limites máximo de resíduos (LMR) a serem adotados no Brasil e estimular práticas de controle preventivo nas propriedades produtoras e nas indústrias de laticínios. A análise do leite foi definida como prioritária por se tratar de um alimento muito consumido pela população brasileira. Definiram-se também os princípios ativos a serem pesquisados: tetraciclinas, beta-lactâmicos, sulfas, abamectina, doramectina e ivermectina (ANVISA, 2006).

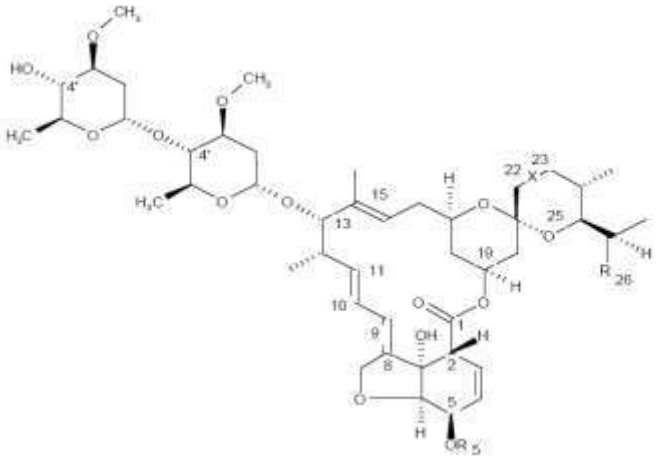
2.4.1 Avermectinas

Ivermectina

A ivermectina é um anti-helmíntico endectocida de amplo espectro de atividade contra muitas espécies de parasitas (CROOKS et al., 1998), membro do grupo de ocorrência natural conhecido como avermectinas (JACKSON, 1989).

As avermectinas são lactonas macrocíclicas produzidas pela fermentação do fungo actinomiceto *Streptomyces avermitilis*. Esse fungo produz uma mistura de oito diferentes componentes: A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a e B2b (Figura 1) (BURG et al., 1979). Dentre estes, a fração B1 é a que possui maior atividade antiparasitária. Na produção industrial é impraticável a separação dos grupos B1a e B1b. Portanto, os produtos comerciais são uma combinação de não menos que 90% do grupo “a” e não mais que 10% do grupo “b”, sendo a atividade biológica destes dois homólogos quase idêntica (SHOOP et al., 1995).

A ivermectina possui fórmula molecular $C_{48}H_{74}O_{14}$ para a ivermectina B1a e $C_{47}H_{72}O_{14}$ para a ivermectina B1b, com respectivos pesos moleculares de 875 e 861 g mol^{-1} (EUROPEAN, 2007).



Avermectina	R_5	R_{26}	C_{22}-X-C_{23}
A_{1a}	CH_3	C_2H_5	-CH=CH-
A_{1b}	CH_3	CH_3	-CH=CH-
B_{1a}	H	C_2H_5	-CH=CH-
B_{1b}	H	CH_3	-CH=CH-
A_{2a}	CH_3	C_2H_5	—C(OH)—C(H_2)—C(H)—
A_{2b}	CH_3	CH_3	—C(OH)—C(H_2)—C(H)—
B_{2a}	H	C_2H_5	—C(OH)—C(H_2)—C(H)—
B_{2b}	H	CH_3	—C(OH)—C(H_2)—C(H)—
Ivermectina	H	>80% C_2H_5 <20% CH_3	-CH_2-CH_2-

Figura 1- Estrutura e fórmulas das avermectinas

O mecanismo de ação da ivermectina baseia-se na paralisia em artrópodes e nematoides ao aumentar a permeabilidade da membrana celular para os íons cloro (Cl^-), com resultante hiperpolarização e paralisia da musculatura da faringe e do corpo dos parasitas. Os efeitos paralisantes são mediados pelos canais de cloro ligados ao ácido gama amino butírico (GABA), ou ao glutamato. Porém, para os efeitos mediados por GABA, são necessárias concentrações mais elevadas do que aquelas para abrir os canais de cloro ligados ao glutamato. A elevada afinidade dessas drogas seria dada pela união das subunidades alfa aos canais de cloro (ARENA et al., 1995).

A hipótese do seu mecanismo de ação agonística do ácido gama amino butírico (GABA) explica porque as avermectinas não agem sobre cestódeos e trematódeos, vez que não possuem os receptores GABA. Sua baixa toxicidade para os mamíferos é explicada pela impossibilidade de atravessar a barreira hematocefálica, não atingindo, assim, tais receptores, pelo fato de restringirem-se quase que, exclusivamente, ao sistema nervoso central (MARTIN et al., 1997).

Devido à alta lipofilicidade, a farmacocinética da ivermectina é caracterizada por um longa persistência no organismo, que é influenciado pela formulação e via de administração (MCKELLAR; BENCHAOUI, 1996; LANUSSE et al., 1997).

A aplicação do medicamento na forma tópica, na dose de 500 $\mu g\ kg^{-1}$ de peso vivo, apresenta resíduos nos músculos, fígado, gordura e no local de aplicação durante 21, 42 e 56 dias, respectivamente (FAO/WHO 1993).

Estudo farmacocinético da ivermectina administrada por via oral demonstra que, aproximadamente, 55% do fármaco administrado são absorvidos e é detectado no plasma em uma hora, atingindo pico plasmático em 4 a 5 horas após o uso. É metabolizado no fígado e seus metabólitos são excretados na bile (TURNER et al., 2005).

As ivermectinas são drogas utilizadas extensivamente em animais produtores de alimentos, sendo de grande importância o monitoramento de seus resíduos em produtos destinados à alimentação humana, uma vez que pode apresentar efeitos negativos sobre a saúde, podendo desencadear o fenômeno da resistência parasitária aos princípios utilizados, além de estudos demonstrarem que os resíduos de ivermectina podem apresentar efeitos mutagênicos e/ou teratogênicos em outras espécies de mamíferos (EMEA, 2004).

Uma importante via de excreção das moléculas endectocidas é a glândula mamária, sendo que cinco e meio por cento da dose de ivermectina é eliminada através do leite (ALVINERIE et al., 1994). Ivermectina atinge concentrações similares ou maiores no leite, quando comparadas com as obtidas no plasma de ovinos e caprinos. O percentual de doses eliminadas no leite é influenciado pelo seu teor de gordura (LANUSSE et al., 2009). Neste sentido, o CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO, 1993) determina o valor de 10 $\mu g\ L^{-1}$ como limite máximo de ivermectina no leite.

2.4.2 Benzimidazóis

Albendazole

O albendazole é um anti-helmíntico pertencente ao grupo dos benzimidazóis que apresenta amplo espectro de ação contra os parasitas e baixa toxicidade para os animais, apresentando alta margem de segurança, sendo, por essa razão, amplamente utilizado em animais de produção (EMEA, 1997; CAPECE et al., 2002). O albendazole ($C_{12}H_{15}N_3O_2S$) apresenta peso molecular de 265,33 g mol^{-1}, com faixa de fusão de 208ºC a 209ºC e maior solubilidade em meio ácido (ANVISA, 2010).

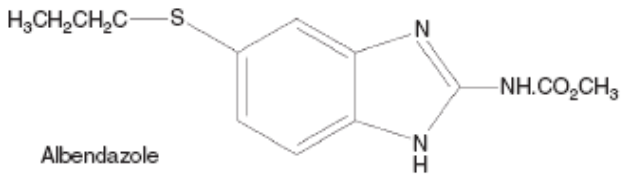


Figura 2 - Estutura do albendazole

O mecanismo de ação consiste na união do albendazole com a tubulina dos helmintos, proteína solúvel que constitui a estrutura básica dos microtúbulos. Diversos estudos têm demonstrado que albendazole se liga de forma irreversível no sítio de ligação da colquicina, subunidade β da tubulina (LACEY, 1990). Os dímeros da tubulina, unidos à molécula do albendazole, não podem se polimerizar para formar os microtúbulos e, dessa forma, alteram o equilíbrio microtúbulos-tubulina. A perda deste equlíbrio bloqueia a absorção e excreção de nutrientes, submetendo o parasita a um jejum hídrico (LANUSSE et al., 2009).

A despolarização dos microtúbulos promove a perda de função de vários componentes da célula, que são dependentes desta estrutura, incluindo a função dos neurotransmissores e outros mensageiros intracelulares, eliminação de produtos de degradação, absorção de nutrientes, divisão celular, organização intracelular e outras interações vitais do tipo proteína-proteína que levam à morte celular (MOLENTO, 2004).

Por outro lado, embora o uso do albendazole tenha se tornado extremamente comum em todo o mundo, os resíduos destes fármacos em animais produtores de alimentos deve ser monitorado, uma vez que a FAO/WHO (1989) tem alertado para seu efeito tóxico,

incluindo alguns estudos sobre efeitos carcinogênicos, genotóxicos e teratogênicos (LANUSSE et al., 2009). Esses autores destacam ainda que os efeitos teratogênicos evidenciados logo após o seu uso em fêmeas ovinas gestantes podem ser explicados por sua ação antimicrotubular.

Apesar das informações sobre a excreção do albendazole e dos seus metabolitos através do leite serem escassas (DAYAN, 2003), a comunidade Europeia estabeleceu o limite máximo de resíduo no leite em 100 $\mu g\ L^{-1}$ (REGULAMENTO (CE)1646/2004).

2.5 Métodos cromatográficos de análises do leite

A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permitem separar componentes semelhantes de misturas complexas (SKOOG et al., 2002). Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (DEGANI et al., 1998).

As técnicas de separação, tais como cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos (RIBANI et al., 2004).

2.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência para análise de resíduos de fármacos

A confiabilidade dos estudos relativos à presença de fármacos em alimentos de origem animal e outras matrizes é extremamente dependente da eficiência do método analítico empregado (SKALAVOUNOS et al., 1994).

A cromatografia líquida de alta eficiência é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação, devido à sensibilidade, à fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, sua adequação à separação de espécies não-voláteis ou termicamente frágeis, além da ampla aplicabilidade às substâncias de grande interesse para muitos campos da ciência, para a indústria e para o público (SKOOG et al., 2002).

Souza et al. (2003b), citando vários autores, destacam que os primeiros métodos publicados para determinação de avermectinas empregavam purificação por extração em

fase sólida e partição líquido:líquido, seguidas de determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em fase normal, com detecção por ultra-violeta (UV). Posteriormente, métodos mais rápidos foram desenvolvidos empregando purificação com cartuchos de extração em fase sólida, seguidos de determinação por CLAE/UV em fase reversa.

Estudos desenvolvidos (PRABHU et al., 1991; SKALAVOUNOS et al., 1994), relacionados a avermectinas, destacam métodos empregando purificação, seguida de derivatização para um composto fluorescente e posterior determinação por CLAE, detecção de fluorescência (FL). Métodos estes que têm sido amplamente utilizados e recomendados por órgãos oficiais de regulamentação (BRASIL, 1999; FAO/WHO, 1999).

A maioria das drogas benzimidazólicas é licenciada para utilização em animais produtores de alimentos. O desenvolvimento de um único método capaz de testar todos os resíduos é muito difícil (DOWLING et al., 2005). Alguns métodos têm sido desenvolvidos para a determinação de albendazole e seus principais metabólitos em plasma humano (BONATO et al., 2003), sendo a maior parte com base em extração líquido/líquido, com determinação com CLAE/UV (DAYAN et al., 2003).

Alguns métodos têm sido relatados para análise de resíduos de benzimidazóis na matriz leite. De Ruyck et al. (2000) e Moreno et al. (2005) empregraram a cromatografia líquida; Xia et al. (2010) destacam a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (UCLAE/EM), obtendo resultados satisfatórios.

2.5.1.1 Preparo de amostras para determinação de resíduos por cromatográfica líquida de alta eficiência

O preparo das amostras constitui-se em uma das etapas mais importantes de um processo analítico. Para evitar interferências e incompatibilidades com equipamentos analíticos, as matrizes geralmente não são analisadas quimicamente na forma bruta, sendo empregados procedimentos de preparo da amostra, com os quais se procura isolar e concentrar os analitos a níveis adequados e obter um nível de limpeza da amostra que não comprometa a sua análise química (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

Amostras biológicas como soro, plasma, urina e leite são consideradas complexas, uma vez que contêm muitos componentes que podem interferir e dificultar suas análises, havendo, portanto, necessidade de pré-tratamento (extração, pré-concentração etc.) para

que possam ser obtidas em meio apropriado e em concentrações adequadas para sua injeção no sistema cromatográfico (PEZZA et al., 2006).

As técnicas de extração e/ou pré-concentração de fármacos em amostras biológicas mais frequentemente utilizadas são: extração líquido-líquido (LLE - *Liquid-Liquid Extraction*), extração em fase sólida (SPE- *Solid Phase Extraction*) (PEZZA et al., 2006), extração por fluido supercrítico (SFE - *Supercritical Fluid Extraction*), e, mais recentemente, a micro extração em fase sólida (SPME- *Solid Phase Microextraction*) (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001). Essas técnicas, executadas a partir de subfrações da amostra original, enriquecidas com substâncias de interesse analítico, permitem a separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (QUEIROZ et al., 2001).

A extração líquido-líquido é uma técnica clássica de preparação de amostras, a qual requer a utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos, necessita de maior tempo de análise (SMITH, 2003) e é de difícil automação (QUEIROZ et al., 2001), quando comparada à extração em fase sólida, a qual demanda menor tempo de análise, menor quantidade de solventes, não forma emulsões, promove o enriquecimento de traços e apresenta alto potencial para automatização (SANTOS NETO; SIQUEIRA, 2005).

A extração por fluido supercrítico tem atraído interesse devido ao seu potencial para análise, mas devido à exigência de equipamento especializado, não tem encontrado ampla aplicação (PEZZA et al., 2006). No tocante à micro extração em fase sólida, esta técnica tem se destacado por ser uma técnica simples, de baixo custo e de fácil automação ((BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001).

Extração em fase sólida (SPE)

Este tipo de extração é muito utilizada pela sua eficácia na purificação de extratos e concentração dos analitos de interesse. Conhecendo as características dos compostos em questão, relativamente à sua polaridade e solubilidade, e se é extraído em meio ácido ou básico, é possível determinar quais as colunas de extração indicadas (FREITAS et al., 2008). Neste tipo de extração, os analitos contidos numa matriz aquosa são extraídos, juntamente com os compostos interferentes, após passarem por um cartucho contendo sorvente. Um solvente orgânico seletivo é geralmente utilizado para remover os

interferentes e, então, outro solvente é usado para lavar os analitos de interesse (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001).

As etapas da extração resumem-se na ativação do sorvente (condicionamento), 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 (CALDAS et al., 2011) (Figura 3). A etapa de condicionamento do cartucho/coluna SPE destina-se a ativar o sorvente, e o solvente a ser utilizado nessa etapa dependerá, principalmente, do material a ser ativado (C8, C18, ciano, sílica, amino, entre outros) (CALDAS et al., 2011).

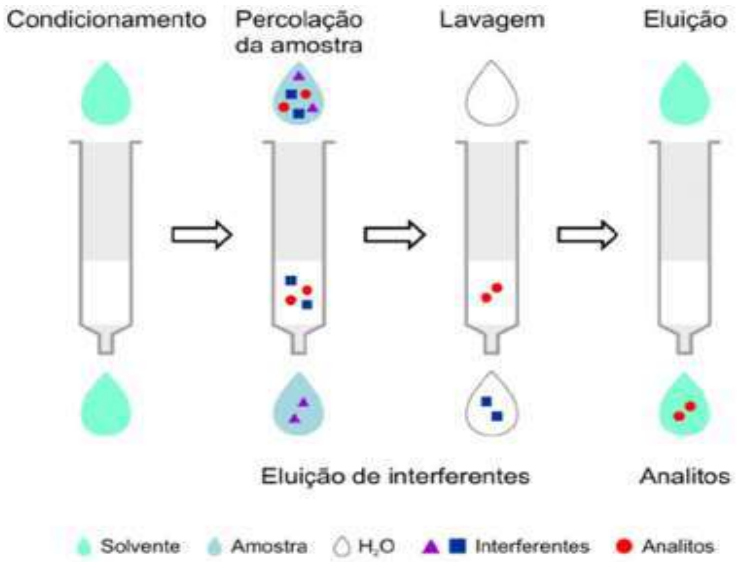


Figura 3 - Etapas envolvidas na SPE: condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito (CALDAS et al., 2011).

Apesar da extração em fase sólida ser uma das técnicas de extração mais utilizadas por apresentar vantagens com relação aos métodos mais clássicos, tais como praticidade e maior sensibilidade, esta técnica tem algumas limitações. Uma delas refere-se à etapa de dessorção do analito aprisionado no cartucho de SPE, que requer, geralmente, o uso de solventes tóxicos (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001).

Estudos foram desenvolvidos utilizando a extração em fase sólida para determinação de fármacos em leite (DISERENS; HENZELIN 1999; POLLMEIER et al., 2002; TURNIPSEED et al., 2005; SOUZA et al., 2007) com posterior determinação em cromatografia líquida de alta eficiência.

2.5.2 Cromatografia gasosa para análise de ácidos graxos em leite

Na cromatografia gasosa (CG), a amostra é convertida para o estado de vapor, e o eluente é um gás inerte que atua como fase móvel. Neste tipo de cromatografia, diferentemente das outras, a fase móvel não interage com as moléculas do analito, tendo como única função o transporte do analito através da coluna (CHRISTIAN, 1994, SKOOG et al., 2002).

Para o estudo dos ácidos graxos, a cromatografia gasosa tem sido a técnica mais aplicada, devido principalmente ao desenvolvimento de fases estacionárias que possibilitam a separação dos diversos isômeros posicionais e geométricos existentes na mistura (SIMIONATO, 2008). Além de possuir um alto poder de resolução, é muito atrativa devido à possibilidade de detecção em escala de nano a picogramas (10^{-9}- 10^{-12} g) (DEGANI et al., 1998).

A composição de ácidos graxos da gordura do leite, determinado pela cromatografia em fase gasosa com coluna capilar, tem sido estudada por muitas décadas e ainda é altamente relevante para a pesquisa e estudos de autenticação do leite (LUNA et al., 2005).

Quando é utilizada a técnica da cromatografia a gás para análise de alimentos, o detector de ionização de chama é o mais conveniente, devido à quantidade mínima detectável (10^{-12} g), resposta quase universal, faixa de linearidade e resposta rápida (COLLINS et al., 2006).

A análise de ácidos graxos apresenta uma certa complexidade devido à vasta gama do tamanho molecular e da presença de grande quantidade de ácidos graxos de cadeia curta (LUNA et al., 2005).

Para a análise de ácidos graxos utilizando cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (FID) do inglês *flame ionization detector*, faz-se necessário a derivatização clássica, que se baseia na conversão dos ácidos graxos em ésteres metílicos de ácidos graxos, permitindo que o ácido graxo se torne mais volátil e menos polar (FUENTE et al., 2006).

2.6 Validação do método analítico para determinação de resíduos farmacológicos no leite caprino

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, numa etapa conhecida como validação (RIBEIRO et al., 2008).

O desenvolvimento de um novo método analítico, a adaptação ou aplicação de um método conhecido, independentemente de quão adequado é o desempenho de um método em um estudo de validação já estabelecido, faz-se necessário atestar a sua eficiência ou confirmar que o método é válido, quando aplicado em usos de rotina por meio de procedimentos de validação (SOUZA et al., 2007; ARAGÃO et al., 2009).

A validação de um método analítico consiste na comprovação através de evidências objetivas, de que são respeitados os requisitos específicos para uma determinada utilização pretendida (ABNT, 2001). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera que "a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados".

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (RIBANI et al., 2004).

Em relação aos parâmetros de desempenho e critérios de aceitação, os laboratórios, ao reproduzir métodos oficiais, são considerados validados quando forem avaliados parâmetros como precisão, especificidade e linearidade. No caso de metodologias não-oficiais, a metodologia só será considerada validada se forem avaliados os seguintes requisitos, quando aplicável: seletividade (especificidade), linearidade, faixa linear e faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003).

Seletividade

A seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003). De acordo Ribani et al. (2004), a seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa.

O termo especificidade tem sido utilizado frequentemente com o mesmo significado de seletividade (RIBANI et al., 2004). No entanto, em relação aos métodos cromatográficos, como a maioria produz respostas não só para os analitos de interesse, mas também para outros compostos presentes em uma amostra, o termo seletividade é mais apropriado que o termo especificidade (CASSIANO et al., 2009).

Linearidade

A linearidade de um método expressa a faixa na qual o sinal analítico, denominado variável dependente *yi*, é linearmente proporcional à sua concentração, denominada variável independente *xi*, e a equação matemática que descreve esta dependência é conhecida como curva analítica ou curva de calibração. O ajuste de qualquer equação matemática é feito pelo método dos quadrados mínimos, no qual a melhor curva será aquela que fornecerá o menor valor para a soma quadrática dos resíduos (Q) obtidos entre o sinal analítico medido e o sinal analítico predito, para um conjunto de N pontos experimentais (RIBEIRO et al., 2008).

A curva de calibração corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área/altura da banda cromatográfica) e a concentração do analito. É necessário elaborar uma curva de calibração para cada analito que se deseja determinar e para cada corrida analítica (ANVISA, 2003).

Faixa linear e Faixa de trabalho

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no

centro da faixa de trabalho. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho (INMETRO, 2003).

Limite de Detecção e Quantificação

Os termos limite de quantificação e limite de detecção são utilizados para demonstrar a habilidade do método em quantificar/detectar baixas concentrações de um analito (CASSIANO et al., 2009).

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, não necessariamente quantificada sob condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como uma concentração do analito que produza um sinal três vezes superior à relação sinal/ruído (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003).

Limite de detecção do método (LDM) é a menor concentração de uma substância que pode ser detectado com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero, determinado através de uma análise completa de uma determinada matriz (INMETRO, 2003).

O limite de detecção pode ser determinado de diversas formas, como a relação sinal/ruído, desvio padrão da resposta, do coeficiente angular, método visual e modelos estatísticos. Desde que sejam estabelecidos critérios de aceitabilidade e comprovado com certo limite de confiança aceitável (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003).

Utilizando o método baseado em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção (LD), de acordo a ANVISA (2003), pode ser expresso como:

$$\mathrm{LD} = 3{,}3 \times \frac{s}{\mathrm{S}}$$

Em que: s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica.

O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito de interesse em uma amostra, que pode ser quantitativamente determinado com valores aceitáveis de precisão e exatidão (CASSIANO et al., 2009).

De acordo Ribani et al. (2004), o limite de quantificação, assim como o limite de detecção, pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta e a inclinação da curva analítica, a partir da equação:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

Em que: s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação ("slope") ou coeficiente angular da curva analítica.

Exatidão

Exatidão é o grau de concordância entre os resultados obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003). Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão são a utilização de materiais de referência certificados (MRC), comparações interlaboratoriais e testes de recuperação (INMETRO, 2003).

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta, da faixa de uso do método (INMETRO, 2003), podendo ser calculada pela equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

Em que: C_1= concentração do analito na amostra fortificada

C_2= concentração do analito na amostra não fortificada

C_3=concentração do analito adicionada à amostra fortificada

Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de amostras semelhantes ou padrões, utilizando certas condições definidas. As duas formas mais comuns de representá-la são por meio de repetitividade e reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão ou desvio padrão relativo (CV%). Ambas são dependentes da concentração do analito e devem ser determinadas por um diferente número de concentrações (INMETRO, 2003).

A precisão em validações de métodos analíticos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003).

Uma das formas de expressar a precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV) que, de acordo a ANVISA (2003), pode ser calculado por:

$$\text{RSD (\%) ou CV (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Em que: x é a média aritmética das determinações e s é a estimativa do desvio padrão da resposta.

Repetitividade

A repetitividade ou repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo (RIBANI et al., 2004). A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição do analito a branco da amostra, em várias concentrações na faixa de trabalho (INMETRO, 2003). A ANVISA utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade (ANVISA, 2003)

Reprodutibilidade

Entende-se por reprodutibilidade o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, usando o mesmo método, efetuadas sob condições variadas (diferentes laboratórios, diferentes analistas e equipamentos) (INMETRO, 2003; RIBANI et al., 2004). No entanto, é possível avaliar a reprodutibilidade parcialmente, na qual somente alguns dos fatores citados são modificados. Neste caso, as variáveis avaliadas devem ser registradas (CASSIANO et al., 2009).

Precisão intermediária

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais) (ISO 5725-3:1994), podendo ser definida como a habilidade do método em fornecer os mesmos resultados, quando as análises são conduzidas no mesmo laboratório, mas em diferentes dias, por diferentes analistas e diferentes equipamentos (CASSIANO et al., 2009).

Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal (ANVISA, 2003). A robustez de um método cromatográfico pode ser avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE (RIBANI et al., 2004).

Para determinar a robustez do método, pode-se recorrer ao teste de *Youden* (INMETRO, 2003; BURIN, 2008), uma vez que o mesmo permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento a sua precisão (INMETRO, 2003).

REFERÊNCIAS

ALVINERIE, M.; SUTRA, J. F.; GALTIER, P; TOUTAIN, P. L. Microdose d`ivermectine chez la vache laitiere: concentrations plasmatiques et residus dan lê lait. **Revue Medicine Veterinare**, v. 169, p. 259-261, 1994.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Resolução 899**, de 29/05/2003, que trata da validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Brasília, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de origem animal – PAMVet**. Relatório 2004/2005: monitoramento de resíduo em leite exposto ao consumo. ANVISA/Ministério da Saúde: 2006, 46 p. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/pamvet/. Acesso em: 10/03/2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. v 2, Brasília: ANVISA, 2010. p. 587.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. DA C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "química verde" na determinação de metilxantinas em bebidas**. Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.

ARENA, J. P.; LIU, K. K.; PARESS, P. S.; FRAZIER, E. G.; CULLY, D. F.; MROZIK, H.; SCHAEFFER, J.M. The mecanism of action of avermectin in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane-binding, and biological activity. **Journal of Parasitology**, v. 81, p. 286-294, 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS–ABNT. **NBR ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Brasil, 2001.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química nova**, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.

BOMFIM, M. A. D.; OLIVEIRA, L. S.; FERNANDES, M. F. Uso da nutrição para a diferenciação e a valorização da qualidade do leite e da carne: um novo paradigma na nutrição de pequenos ruminantes. I Congresso Brasileiro de Nutrição Animal. **Anais...** Fortaleza, p .1-19. 2008.

BONATO, P. S.; LANCHOTE, V. L.; TAKAYANAGUI, O. M. Simultaneous liquid chromatography–tandem mass spectrometric determination of albendazole sulfoxide and albendazole sulfone in plasma. **Journal of chromatography B**, v. 783, p. 237–245. 2003.

BOZA, J.; SANZ SAMPELAYO, M. R. Aspectos nutricionales de la leche de cabra. **Anales de la Academia Ciencias Veterinárias de Andalucia Oriental**, v. 10, p. 109-139, 1997.

BRANDON D. L.; BATES, A. H.; BINDER R. G.; MONTAGUE JR, W. C.; WHITEHAND L. C.; BARKER S. A. Analysis of fenbendazole residues in bovine milk by ELISA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5791-6. 2002.

BRASIL. Leis e Decretos, Dec. n° 9.525 de 15/12/86. Diário oficial do estado ao Rio de Janeiro, de 1986 18/12/86. Ano 12 n° 239, Pt. I **Dispõe sobre a produção e o beneficiamento artesanais do leite de cabra no estado do Rio de Janeiro**.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução normativa 3**. Diário Oficial da União. Brasília, 17 fev. 1999. Seção 1, p. 15-33.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. **Instrução Normativa nº 37**. 2000.

BURG, R. W; MILLER, B. M.; BAKER, E. E.; BIRNBAUM, J.; CURRIE, S. A, HARTMAN, R.; KONG, Y. L. MONAGHAN, R. L.; OLSON, G.; PUTTER, I.; TUNAC, J. B.; WALLICK, H.; STAPLEY, E. O.; OIWA, R.; OMURA, S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermantation. **Antimicrob. Agents Chemother**., v. 15, p. 361-367, 1979.

BURIN, R.; BURIN, V. M.; TAHA, P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Validação de uma metodologia analítica para determinação de cálcio em produtos cárneos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n.4, p. 973-978, 2008.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G. 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**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CAPECE, B. P. S.; PÉREZ, R.; ANDALUZ, A.; PÉREZ; GARCIA, F.; CASTELLS, G.; ARBOIX, M.; CRISTÒFOL, C. Placental transfer of albendazole sulphoxide enantiomers in sheep. **Veterinary Journal**, v.163, p.155–160, 2002.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R., OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CENACHI, D. B.; FURTADO,M. A. M.; BELL,M. J. V.; PEREIRA, M. S.; GARRIDO, A.; PINTO, M. A. DE O. Aspectos composicionais, propriedades funcionais, nutricionais e

sensoriais do leite de cabra: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 382, p. 12-20, 2011.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; DOREAU, M. Contrôle de la qualité nutritionnelle des matières grasses du lait par l'alimentation des vaches laitières: acides gras trans, polyinsaturés, acide linoléique conjugué. **INRA Productions Animales**. v. 14, p. 23-335, 2001.

CHILLIARD, Y.; ROUEL, J.; LEROUX, C. Goats alpha-s1 casein genotype influence its milk fatty acid composition and delta-9 desaturation ratios. **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, p. 474-487, 2006.

CHRISTIAN, G. D. **Analytical Chemistry**. 5ª Edição. 1994. p. 505-561.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora Unicamp, Campinas, São Paulo, 2006.

COSTA, R. G.; MESQUITA, I. V. U.; QUEIROGA, R. DE C. R. DO E.; MEDEIROS, A. N. DE, CARVALHO, F. F. R. DE, FILHO, E. M. B. Características químicas e sensoriais do leite de cabras Moxotó alimentadas com silagem de maniçoba. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 4, p. 694-702, 2008.

COULON, J. B.; PRIOLO, A. La qualité sensorielle des produits laitiers et de la viande dépend des fourrages consommés par les animaux. **INRA Productions Animales**, v. 15, n. 5, p. 333-342, 2002.

CROOKS, S. R. H., BAXTER, A. G., TRAYNOR, I. M., ELLIOTT, C. T., MCCAUGHEY, W. J. Detection of ivermectin residues in bovine liver using na enzyme immunoassay. **Analyst**, v. 123, p. 355-358, 1998.

DAYAN, A.D. Albendazole, Mebendazole and Praziquantel. Review of Non-Clinical Toxicity and Pharmacokinetics. **Acta Tropica**, v. 86 n. 2-3, p. 141-159, 2003.

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

DE RUYCK, H.; VAN RENTERGHEM, R.; DE RIDDER, H.; DE BRABANDER, D. Determination of anthelmintic residues in milk by high performance liquid chromatography. **Food Control**, v. 11, p. 165-173, 2000.

DISERENS, H., HENZELIN, M. Determination of abamectin residues in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 833, p. 13–18, 1999.

DOWLING, G.; CANTWELL, H.; O'KEEFFE, M.; SMYTH, M. R. Multi-residue method for the determination of benzimidazoles in bovine liver. **Analytica Chimica Acta**, v. 529, p. 285-292, 2005.

DUBEUF, J.P. Structural, market and organizational conditions for developing goat dairy production systems. **Small Ruminant Research**, v. 60, p. 67-74, 2005.

EMEA. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, **EMEA/MRL/247/97-FINAL, 1997**, Albendazole summary report 2.

EMEA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY**. EMEA/MRL/915/04-FINAL**. 2004. Disponível em: http://www.emea.europa.eu/emea. Acesso em: 05/10/2011.

EUROPEAN. **Pharmacopoeia**. 6. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - **FAO, 2006. Statistical databases**. http://www.apps.fao.org. Acesso 30/01/2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO, 2011. **FAOSTAT – FAO Statistics Division/ProdSTAT: livestock (primary and processed)**. Disponível em: http://faostat.fao.org/site/596/DesktopDefault.aspx?PageID=569 Acesso em: 25/01/2013.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2001. 175 p.

FREITAS, A. A. R. **Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a detecção e quantificação da Amoxicilina em músculo, por LC-MS/MS.** 82 p. 2008. Dissertação (Mestrado) - Instituto Superior técnico. Universidade Técnica de Lisboa.

FUENTE, M. A. de la; LUNA, P.; JUAREZ, M. Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers. **Trends in Analytical Chemistry**, v.25, n. 9, p. 917-926, 2006.

GOMES, V.; LIBERA, A. M. M. P. D.; MADUREIRA, K. M.; ARAÚJO W. P. Influência do estágio de lactação na composição do leite de cabras (*Capra hircus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 339-342, 2004.

GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S.; PERES, J. R.; BARROS, L.; CEBALLO, P. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: UFRGS, 2001. 77 p.

GONZÁLEZ, F.H.D. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. 2ª ed. Porto Alegre:UFRGS, 2006. 360 p.

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**. v.51, p.154–163, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. rev. 1. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003. 36 p.

ISO 5725-3:1994 (2001). Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - **Part 3: Intermediate Measures of Precision of a Standard Measurement Method.**

JACKSON, H. Ivermectin as a systemic insecticide. **Parasitology Today**, v. 5, p.146-155, 1989.

JACOPINI, L. A.; MARTINS, E. N.; LOURENÇO; D. A.L.; DERÓIDE, C. A. DOS S. Leite de cabra: características e qualidades. **Revista ACTA Tecnológica**, v. 6, n. p. 168-180, jan-jun. 2011.

JOINT FAO/WHO CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION: list of Codex MRLs for vet drugs. In: **Residues of vet drugs in foods**. Rome. 1993. v. 3, seção 1.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. Codex alimentarius. **Fifty-second meeting**. Rome. 1999.

JOINT FAO/WHO COMITÉ MIXTO DE EXPERTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIUS. Evaluación de ciertos residuos farmacos de uso veterinario en los alimentos. **34º Informe del Comité Mixto FAO/WHO de Expertos en Aditivos Alimentarios**. 1989. 72 p.

LACEY, E. Mode of action of benzimidazole. **Parasitology Today**, v. 6, p. 112-115, 1990.

LANUSSE, C.; LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; ALVAREZ, L.; SÁNCHEZ, S.; SUTRA, J. F.; GAULTIER, P.; ALVINERIE, M. Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, p.91-99. 1997.

LANUSSE, C. E.; ALVAREZ, L. I.; LIFSCHITZ,A, L. **Princípios farmacológicos da terapia anti-helmíntica**. CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. (Eds). Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. 2009. p. 549-603.

LÓPEZ-ALIAGA, I.; ALFÉREZ, M. J. M.; BARRIONUEVO, M.; LISBONA, F. ; CAMPOS, M. S. Influence of goat and cow milk on the digestive and metabolic utilization of calcium and iron. **Journal Physiology Biochemistry**, v.56, n.3, p. 201- 208, 2000.

LUNA, P.; FONTECHA, J.; JUÁREZ, M.; FUENTE, M.A. de la. Conjugated linoleic acid in ewe milk fat. **Journal Dairy Research**,v. 72, n.4, 415-24. 2005.

MARTIN R. J. Modes of Action of Anthelmintic Drugs: Review. **The Veterinary Journal**, v.154, p.11-34, 1997.

MCKELLAR, Q. A.; BENCHAOUI, H. A. Avermectins and milbemycins. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, p. 331–351. 1996.

MEDEIROS, A. N. DE.; SILVA, T. M.; ALVES, A. R..; BEELEN, P. M. G. Inovações no manejo nutricional de ovinos e caprinos. In: XXI Congresso Brasileiro de Zootecnia. **Anais...** Editores: Universidade Federal de Alagoas e Associação Brasileira de Zootecnistas (ABZ), AL. p. 1-17. 2011.

MENDES, C. G.; SILVA, J. B. A.; ABRANTES, M. R. Caracterização organoléptica, físico-química, e microbiológica do leite de cabra: uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 3, n. 1, p. 5-12, 2009.

MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 13, p. 82-86, 2004.

MORAND-FEHR, P. Recent developments in goat nutrition and application: A review. **Small Ruminant Research**, v. 60, p. 25-43, 2005.

MORENO, L.; IMPERIALE, F.; MOTTIER, L.; ALVAREZ, L.; LANUSSE, C. Comparison of milk residue profiles after oral and subcutaneous administration of benzimidazole anthelmintics to dairy cows. **Analytica Chimica Acta**, v. 536, p. 91-99, 2005.

PALMQUIST, D. L.; BEAULIEU, A. D. Feed and Animal Factors Influencing Milk Fat Composition. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 6, p. 1753-1771, 1993.

PARK, Y.W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G.F.W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 88-13, 2007.

PEZZA, L.; RIOS, À.; NOZAL, L.; ARCE, L.; VALCÁRCEL, M. Determinação simultânea de resíduos de cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol em leite bovino por cromatografia eletrocinética micelar. **Quimica Nova**, v. 29, n. 5, p. 926-931, 2006.

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

PRABHU, S. V.; WEHNER, T. A.; TWAY, P. C. Determination of ivermectin levels in swine tissues at the parts per billion level by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1468-1471, 1991.

PRANDINI, A.; SIGOLO, S.; TANSINI, G; BROGNA, N.; PIVA, GIANFRANCO Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 6, p. 472-479, 2007.

QUEIROGA, R. C. R. E.; TRIGUEIRO, I. N. S.; FERREIRA, M. C. C. Caracterização do leite de cabras mestiças no brejo paraibano, durante o período de lactação. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 58, p. 77-80, 1998.

QUEIROGA, R. C. R. E.; COSTA, R. G.; BISCOTINI, T. M. B.; MEDEIROS, A. N.; MADRUGA, M. S.; SCHULER, A. R. P. Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite de cabras Saanen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 430-437, 2007.

REGULAMENTO (CE) N. 1646/2004 DA COMISSÃO de 20 de Setembro de 2004. **Jornal Oficial da União Européia**, 2004, L 296/5.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n.5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, E. L. de A.; RIBEIRO, H. J. S. de S. Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 229-235, 2001.

RIBEIRO, F. A. de L.; FERREIRA M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R. da, SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito navalidação de métodos analíticos univariados. **Quimica Nova**, v. 31, n. 1, 164-171, 2008.

SANTOS NETO, A. J. DOS; SIQUEIRA, M. E. P. B. DE. Análise de praguicidas organofosforados em água por extração em fase sólida (SPE) utilizando discos c18 e cromatografia em fase gasosa: avaliação da contaminação do reservatório de furnas (MG-Brasil). **Química nova**, v. 28, n. 5, p. 747-750, 2005.

SANZ SAMPELAYO, M. R.; CHILLIARD, Y.; SCHMIDELY, P. H.; BOZA, J. Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research** v. 68, p. 42-63, 2007.

SHOOP, W. L.; MROZIK, H.; FISHER, M. H. Structure and of avermectins and milbemycins helth. **Veterinary Parasitology**, v. 59, p. 139-156, 1995.

SILVA P. H. F. Leite: aspectos de composição e propriedades. **Revista Química Nova na Escola**, v. 6, p. 3-5. 1997.

SIMIONATO, J. I. **Composição química e quantificação de ácidos graxos com ênfase ao ácido linoléico conjugado (CLA) em leite e derivados**. 2008. 130 f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

SMITH, R. M. Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 3-27, 2003.

SIQUEIRA, I. de N. **Características físico-químicas e pesquisa de resíduos de antibióticos no leite de cabra cru nas usinas do Cairiri Paraibano.** 82p. 2007. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária de pequenos Ruminantes- Universidade Federal de Campina Grande, Patos.

SKALAVOUNOS, C.; DEMERS, N.; LUKASZEWICZ, J.; NOWAKOWSKI, M. Photoisomerization of aromatic doramectin derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1228-1231, 1994.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Seção V: Métodos de separação**. In: Princípios de Análise Instrumental. 5ª Edição. Porto Alegre: Bookman, 2002. p. 597-702.

SOUZA, V de.; ROSSI, D. A.; MUNDIM, A. V.; BARROS, I. J. C. Contagem de células somáticas no leite caprino: Influência da ordem e estágio de lactação. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 33, v. 58; p. 43-47, 2003a.

SOUZA, S. V. C.; SILVA, G.; DINIZ, M. H. G. M.; SANTOS, E. V.; LIMA, J. A.; TEODORO J. C. Determinação de resíduos de avermectinas em fígado bovino por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 54-58, 2003b.

SOUZA, S. V. C. de; LIMA J. A.; TEODORO, J. C.; JUNQUEIRA, R. G. Validação intralaboratorial de método quantitativo para determinação múltipla de resíduos de avermectinas em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p.823-836, 2007.

STRZAŁKOWSKA, N.; JÓŹWIK, A.; BAGNICKA, E.; KRZYŻEWSKI, J.; HORBAŃCZUK K.; PYZEL B.; HORBAŃCZUK, J. O. Chemical composition, physical traits and fatty acid profile of goat milk as related to the stage of lactation. **Animal Science Papers and Reports**, v. 27, n. 4, 311-320, 2009.

TURNER S. A.; MACLEAN J. D.; FLECKENSTEIN L.; GREENAWAY, C. Parenteral administration of ivermectin in a patient with disseminated strongyloidiasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 911-914, 2005.

TURNIPSEED, S. B.; ROYBAL, J. E.; ANDERSEN, W. C., KUCK, L. R. 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,** v. 529, p. 159–165, 2005.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. da. **Obtenção do leite**. Boletim Técnico - PIE-UFES:01207, 2007. 9 p.

WANDER, A. E.; MARTINS, E. C. **Viabilidade econômica da caprinocultura leiteira**. Anuário Brasileiro de Caprinos & Ovinos, Uberaba: Agropecuária Tropical, 2008.

WATTIAUX, M. A. **Secreção do leite no úbere da vaca de leite**. Instituto Babcock para Pesquisa e Desenvolvimento da Pecuária Leiteira Internacional - University of Wisconsin-Madison. Disponível em: http://professor.ucg.br/siteDocente/admin/arquivosUpload/4383/material/20_secre%C3%A7ao_do_leite.pdf. Acesso em: 20/01/ 2010.

XIA, X.; DONG,Y.; LUO, P.; WANG, X.; LI, X.; DINGA, S.; SHEN, J. Determination of benzimidazole residues in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 878 p. 3174–3180, 2010.

CAPÍTULO I

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO LEITE DE CABRAS NATIVAS CRIADAS EM SISTEMA EXTENSIVO NA CAATINGA[‡]

RESUMO

Este estudo objetivou caracterizar os aspectos físico-químicos e a composição de ácidos graxos do leite de cabras nativas criadas em sistema extensivo na Caatinga. Para tanto, foram utilizadas 10 cabras lactantes, pluríparas, pertencentes a um rebanho de 240 matrizes sem raça definida criadas extensivamente em pastagem nativa na Caatinga. As matrizes foram acompanhadas do parto aos 90 dias de lactação, com coletas quinzenais de amostras de leite para posteriores análises. A acidez titulável variou de 15,5°D a 18,4°D. A densidade apresentou valor médio de 1028,9 g L^{-1}. Os teores de gordura variaram de maneira expressiva entre os dias 15 e 45 de lactação (2,5±0,6 vs 3,7±1,4; P<0,05). O extrato seco total variou ao longo da lactação, tendo alcançado o maior e menor valor (12,4±1,2 vs 10,1±1,1; P<0,05) no 30º e 90º dia, respectivamente. Em relação ao extrato seco desengordurado, os valores mais altos e mais baixos foram verificados no 30º (9,2±0,3) e 90º dia (7,2±0,8), respectivamente (P<0,05). Os teores de lactose e proteína não diferiram no período de lactação (P>0,05) com percentuais médios de 4,5% e 3,2%, respectivamente. Houve diferenças significativas (P<0,05) entre os ácidos graxos ao longo de 90 dias da lactação, observando-se os maiores percentuais de ácidos graxos saturados no 30° dia da lactação e para os ácidos graxos insaturados no 45° e 60° da lactação. O leite de cabras nativas apresenta predominância de ácidos graxos saturados, mantendo, ao longo da lactação, uma proporção média de 78:20:2 para ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, respectivamente. Os aspectos físico-químicos do leite de cabras nativas criadas em sistema extensivo da caatinga apresentam variações significativas ao longo da lactação.

Palavras-chave: ácidos graxos, composição do leite, leite caprino, semiárido.

[‡] Enviado para publicação na Revista Caatinga

CHAPTER I

PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERISTICS AND LIPIDIC COMPOSITION OF THE MILK FROM NATIVE GOATS RAISED IN AN EXTENSIVE SYSTEM IN THE CAATINGA

ABSTRACT

This study aimed to characterize the physical-chemical aspects and the composition of fatty acids of the milk from native goats raised in an extensive system in the Caatinga. To do so, one used 10 lactating pluriparous goats belonging to a herd of 240 mongrel arrays raised extensively on native pasture in the Caatinga. The arrays were followed from their birth to the 90th day of lactation, with fortnightly collections of milk samples for further analyses. The titratable acidity ranged from 15.5°D to 18.4°D. Density showed an average value of 1028.9 g L^{-1}. The fat content varied in a significant way between the 15th and the 45th day of lactation (2.5±0.6 vs 3.7±1.4; $P<0.05$). The total dry extract varied over the lactation period, reaching the highest and the lowest value (12.4±1.2 vs 10.1±1.1; $P<0.05$) on the 30th and the 90th day, respectively. Regarding the defatted dry extract, the highest and the lowest values were found on the 30th (9.2 ± 0.3) and on the 90th day (7.2±0.8), respectively ($P<0.05$). Lactose and protein contents did not differ over the lactation period ($P>0.05$) with average percentages of 4.5% and 3.2%, respectively. There were significant differences ($P<0.05$) between the fatty acids over the 90 days of lactation, the highest percentages of saturated fatty acids being observed on the 30th day of lactation and for the unsaturated fatty acids on the 45th and the 60th day of lactation. The milk from native goats shows predominance of saturated fatty acids, maintaining an average ratio of 78:20:2 over the lactation period for saturated fatty, monounsaturated and polyunsaturated acids, respectively. The physical-chemical aspects of the milk from native goats raised in an extensive system in the Caatinga show significant variations over the lactation period.

Keywords: fatty acids, milk composition, goat milk, semi-arid.

3.1 INTRODUÇÃO

O leite de cabra, pelas suas características físicas e químicas diferenciadas, apresenta alto valor nutritivo, hipoalergenicidade e elevada digestibilidade, sendo indicado para crianças, adultos, idosos e pessoas com restrições alimentares (PARK, 1994; PARK et al., 2007).

O conhecimento da composição lipídica dos alimentos é importante para a nutrição humana, com relevante atenção em casos de patologias cardiovasculares. Os lipídios são um dos mais importantes componentes da qualidade tecnológica e nutricional do leite caprino, uma vez que influencia na coloração, sabor, odor, rendimento e consistência dos produtos (CHILLIARD et al., 2003; QUEIROGA et al., 2007; EKNAES et al., 2009).

O leite de caprinos tem uma gordura rica em ácidos graxos de cadeia curta contendo de 6-10 átomos de carbono, denominados de caproico (C6:0), caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0). Estes três ácidos graxos juntos compõem cerca de 15-18% da gordura do leite de cabra (BOZA; SANZ SAMPELAYO, 1997).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para subsidiar a linha de produção do leite de cabra, determinou, por meio da Instrução Normativa 37, os valores limites para os parâmetros físico-químicos de acidez, densidade, gordura, lactose, proteína e extrato seco desengordurado, regulamentando desde os aspectos de produção até o processamento (BRASIL, 2000).

As informações sobre a composição do leite de cabra no Brasil é proveniente de estudos realizados com caprinos leiteiros, em especial da raça Saanen (GOMES et al., 2004). No entanto, na região Nordeste, a maioria absoluta dos caprinos é do tipo sem raça definida (SRD), os quais, embora apresentem baixa produtividade, contribuem de forma significativa para a oferta de leite para a população de baixa renda.

Considerando que a composição do leite pode sofrer influência de diversos fatores, incluindo dias de lactação (MORAND-FEHR, 2005; QUEIROGA et al., 2007), este estudo objetivou caracterizar os aspectos físico-químicos e a composição de ácidos graxos do leite de cabras nativas (SRD) criadas em sistema extensivo na Caatinga.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta de amostras de leite

As amostras foram obtidas a partir de um rebanho pertencente à Fazenda Várzea Comprida, localizada no município de Brumado-BA (13°39'13”S, 41°50'37”O), a 422 m de altitude, clima semiárido, temperatura média anual de 25ºC e precipitação pluviométrica média de 653 mm/ano (INMET, 2006).

Para este estudo, foram selecionadas 10 cabras lactantes, pluríparas, pertencentes a um rebanho de 240 matrizes sem raça definida, criadas extensivamente em pastagem nativa da caatinga. As matrizes foram acompanhadas do parto aos 90 dias de lactação, em coletas quinzenais de amostras de leite, entre os meses de abril a junho de 2011.

As amostras de leite (300 mL) obtidas por ordenha manual foram acondicionadas em sacos plásticos descartáveis, devidamente identificadas e então mantidas em freezer a -20ºC. As análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Água e Alimentos, Laboratório de Nutrição Animal e no Centro de Análises Cromatográficas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB.

3.2.2 Processamento das amostras

Para caracterização físico-química do leite, foram determinados acidez, expressa em °D; índice de densidade por leitura em termolactodensímetro a 15ºC; teor de gordura, utilizando-se o lactobutirômetro de Gerber; lactose (em g/100 g), pela redução de Fehling (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985); teor de proteína, pelo método Kjedahl (métodos AOAC, 991.20 e 991.23), utilizando o fator 6,38 para conversão do percentual de nitrogênio em percentual proteico. O extrato seco foi obtido pela equação de Fleischmann $\%EST = 1{,}2G + 2{,}655[(100D - 100)/D]$, (em que G é o percentual de gordura e D a densidade) e o extrato seco desengordurado obtido pela diferença entre o valor do EST e o percentual de gordura (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Para determinação da composição lipídica, cada amostra (50,0 mL) foi centrifugada a 8064 x *g*, por 30 min., a 4 ºC, em Centrífuga de Alta Rotação (Himac CF 16RX II, Hitachi, Japão) e a fração lipídica, camada sólida formada na parte superior, foi coletada e

armazenada em frascos do tipo Eppendorf, mantidos sob refrigeração para posterior análise, conforme sugerido por Reveneau (2008).

A fração lipídica foi submetida à preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos na seguinte ordem: 5,0 mL de solução de metóxido de sódio 0,25 mol L^{-1} em metanol-dietil éter (1:1), em tubo de tampa rosqueável com aproximadamente 150 mg de lipídios e agitado por três minutos; à mistura, foram adicionados 2,0 mL de iso-octano e 10,0 mL de solução saturada de cloreto de sódio, novamente agitado e deixado em repouso para separação das fases; o sobrenadante foi transferido para frascos do tipo Eppendorf, devidamente identificados, para posterior análise cromatográfica (BANNON et al., 1982, modificado por SIMIONATO et al., 2010).

A análise dos ésteres dos ácidos graxos foi realizada através de sistema de cromatografia gasosa modelo Trace-GC-Ultra, com Detector de Ionização de Chama (DIC) e coluna capilar de sílica fundida BPX-70 (120m, 0,25mm d.i) (CG, Thermo Finnigan, USA).

As vazões dos gases (White Martins) foram de 8,0 mL min^{-1} para o gás de arraste - N_2; 30 mL min^{-1} para o gás auxiliar - N_2; 30 mL min^{-1} para o H_2 e 250 mL min^{-1} para o ar sintético da chama. A razão da divisão da amostra foi de 90:10 (LACERDA, 2012, modificado).

As temperaturas do injetor e detector foram 250°C e 280°C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada a 140°C por 10 minutos, seguido por uma primeira rampa de 15°C min^{-1} até atingir 200°C, permanecendo por 1 minuto. A segunda rampa foi de 10°C min^{-1} até atingir 230°C, permanecendo 1 minuto nesta temperatura. A terceira rampa de 0,4°C min^{-1} até atingir 233°C, permanecendo por 2 minutos. A última rampa foi de 0,5°C min^{-1} até atingir 238°C, permanecendo por 4 minutos (COSTA et al., 2011, modificado).

As injeções foram realizadas em triplicata com volumes das injeções de 1,2 μL e o tempo total da análise foi de 42,50 minutos. Para a identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos, foram utilizados padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos contendo os isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoléico (189-19, O-5632 e O-5626, Sigma, EUA).

3.2.3 Interpretação dos resultados e análise estatística

A interpretação dos resultados foi realizada com base na Instrução Normativa 37 do Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do leite de cabra (BRASIL, 2000).

Na análise estatística, os dados quantitativos obtidos foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste Duncan (SAS, versão 8.0). As diferenças foram consideradas significativas com $P<0,05$. As correlações entre os parâmetros físico-químicos foram avaliadas através da correlação de Pearson do PROC CORR (SAS, versão 8.0), sendo consideradas significativas com $P<0,01$.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de acidez oscilaram ao longo do período de 90 dias de lactação, com valor médio de 16,9°D. O valor mais elevado (18,4°D) foi verificado no 30º dia e o menor (15,5°D) no 90º dia (P<0,05). O valor médio foi superior ao encontrado por Queiroga et al. (2007), trabalhando com cabras da raça Saanen (15,2°D). No entanto, os valores encontrados no presente estudo, em maioria, estão dentro dos limites estabelecidos (13-18 ºD) pela IN-37 (BRASIL, 2000).

Valores elevados de acidez podem estar relacionados a componentes como dióxido de carbono, proteínas, citratos e fosfatos, cuja concentração pode sofrer variações expressivas (GONZÁLEZ et al., 2001). Por outro lado, altos níveis de ácido lático, resultante da conversão da lactose em ácido láctico por ação de bactérias, também pode contribuir para a elevação da acidez do leite. Portanto, as variações observadas nos valores de acidez encontradas no presente estudo, podem estar relacionadas às diferenças nos teores de componentes acidídicos, ao perfil microbiológico do leite e à diversidade genética das cabras nativas.

A densidade no 30º dia da lactação mostrou-se mais alta que no 90º dia (1033,1 vs 1025,6 g L^{-1}, P<0,05). A despeito da variação ao longo da lactação, a densidade apresentou valor médio de 1028,9 g L^{-1} (Tabela 1), o qual se encontra dentro dos limites estabelecidos pela IN-37 (1028 a 1033 g L^{-1}).

Os teores de gordura variaram no período de lactação, havendo diferença entre os dias 15 e 75 (2,5% vs 3,7%, P<0,05), sendo que nos dias 15, 60 e 90 os valores foram menores que o limite mínimo de 2,9%, estabelecido pela IN-37. Valores inferiores a 2,9% podem ser admitidos, caso seja comprovado que o teor médio de gordura do rebanho não atinja esse nível (BRASIL, 2000).

Gomes et al. (2004), trabalhando com leite de cabra da raça Saanen, observaram que o percentual de gordura aumentou do primeiro até o quarto mês de lactação, quando alcançou 5,4%, valor superior ao verificado no presente estudo. O teor de gordura no leite, sua composição e rendimento dependem, principalmente, da base genética do animal e da natureza e composição da dieta que o mesmo recebe (BOZA; SANZ SAMPELAYO, 1997). Considerando que a alimentação exerce efeito direto sobre o percentual de gordura, as oscilações verificadas nesse parâmetro podem ter sido consequência da heterogeneidade da pastagem nativa da Caatinga ao longo do período avaliado.

A observação de valores médios de densidade e gordura próximos ao limite inferior e ainda o fato de alguns valores terem se mostrado abaixo do estabelecido pela IN-37 pode proporcionar consequências negativas para o produtor, podendo ser descartado na recepção da indústria por não atender aos limites estabelecidos pela legislação. Esses achados remetem à necessidade de revisão da legislação vigente, adequando-a também aos parâmetros físico-químicos do expressivo rebanho de cabras nativas da região Nordeste.

O extrato seco total (EST) também variou ao longo da lactação, alcançando o maior e menor valor nos dias 30 e 90 (12,4% vs 10,1%, P<0,05). O mesmo ocorreu com o extrato seco desengordurado (ESD), cujos valores mais alto e mais baixo nos dias 30 e 90 foram 9,2% e 7,2%, respectivamente, sendo que o valor mínimo estabelecido pela IN 37 é 8,2%. O EST é um parâmetro estratégico do ponto de vista produtivo, uma vez que apresenta influência direta sobre o rendimento dos produtos derivados lácteos (COSTA et al., 2008).

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos do leite de cabras nativas criadas em sistema extensivo na Caatinga.

Dias de Lactação	Parâmetros físico-químicos						
	Acidez (ºD)	Densidade (g L^{-1})	Gordura (%)	EST (%)	ESD (%)	Lactose (%)	Proteína (%)
15	16,9 ^{ab}	1030,4 ^{ab}	2,5 ^{b}	10,8 ^{ab}	8,2 ^{bc}	4,7 ^{a}	3,4 ^{a}
30	18,4 ^{a}	1033,1^{a}	3,3 ^{ab}	12,4 ^{a}	9,2 ^{a}	4,4 ^{a}	3,2 ^{a}
45	16,0 ^{ab}	1028,5 ^{bc}	3,7 ^{a}	11,9 ^{ab}	8,1^{bc}	4,4 ^{a}	3,1 ^{a}
60	17,0 ^{ab}	1026,6 ^{c}	2,7 ^{ab}	10,2 ^{b}	7,4 ^{cd}	4,5 ^{a}	3,0 ^{a}
75	17,5 ^{ab}	1028,9 ^{bc}	3,7 ^{a}	12,2 ^{a}	8,5 ^{ab}	4,6 ^{a}	3,0 ^{a}
90	15,5 ^{b}	1025,6 ^{c}	2,8 ^{ab}	10,1^{b}	7,2 ^{d}	4,3 ^{a}	3,3 ^{a}
EP	0,42	1,09	0,21	0,4	0,3	0,06	0,06

EP = erro padrão
Dia zero = dia do parto
Valores com letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste Duncan (P<0,05)

Os teores de lactose não variaram durante o período de 90 dias de lactação, cujo valor médio foi de 4,5%. Os valores encontrados (4,3-4,7%) estão acima dos limites estabelecidos pela IN-37 (4,3%).

Embora Mestawet et al. (2012) relataram influência da fase da lactação sobre o percentual de lactose em cabras nativas da Etiópia, Ferreira e Queiroga (2003) descreveram que os teores de lactose são estáveis ao longo da lactação de cabras das raças Anglonubiana, Parda Alemã e British Alpine, corroborando com os achados do presente estudo. Essa estabilidade é atribuída à função reguladora da pressão osmótica exercida pela

lactose, haja vista a estreita relação existente entre a sua síntese e a quantidade de água drenada para o leite (GONZÁLEZ et al., 2001; QUEIROGA et al., 2007).

Os teores de proteína não apresentaram variações durante o período de lactação observado, cujo valor médio de 3,2% está acima do valor mínimo (2,8%) preconizado pela IN-37, demonstrando a elevada qualidade nutricional do leite das cabras nativas. Resultados semelhantes foram obtidos por Rota et al. (1993) e Gomes et al. (2004).

Alguns estudos mostram que os teores de proteína sofrem influência do período de lactação (AGANGA et al., 2002; PRASAD; SENGAR, 2002; FERREIRA; QUEIROGA, 2003), no entanto, as informações são inconsistentes. Enquanto Queiroga et al. (2007) e Greyling et al. (2004) relataram que o teor de proteína tende a aumentar com o avanço da lactação, Fekadu et al. (2005) observaram que o teor de proteína foi semelhante no início e final da lactação.

Com o avanço do período de lactação, ocorre naturalmente diminuição na quantidade de leite produzido, o que possibilita o aumento relativo de constituintes como gordura e proteína (QUEIROGA et al., 2007). Isso pode ser justificado em parte pelo efeito da diluição, uma vez que o teor total de sólidos varia em função do volume diário de leite produzido. Essa situação não foi verificada no presente estudo, provavelmente devido ao fato das cabras nativas apresentarem período de lactação mais curto que as cabras de raças especializadas.

Os teores de proteína e lactose não apresentaram correlação com nenhum dos parâmetros físico-químicos observados. As correlações entre densidade e acidez, acidez e ESD, gordura e ESD foram médias e positivas ($P<0,01$).

As correlações entre a densidade e o ESD e EST, entre o percentual de gordura e EST e ainda entre EST e ESD foram realizadas, porém não foram consideradas neste estudo, uma vez que, para a determinação do EST, pela equação de Fleischmann, são considerados a densidade e o percentual de gordura, desta maneira, a existência de correlação positiva e elevada entre o percentual de gordura e EST seria esperada. Da mesma forma, seria lógica a correlação positiva e alta entre EST e ESD, uma vez que o ESD é o resultado da subtração do EST pela percentual de gordura.

Tabela 2 - Correlações entre os parâmetros físico-químicos do leite de cabras nativas criadas em sistema extensivo na Caatinga.

	Acidez	Gordura	EST	ESD	Lactose	Proteína
Densidade	0,47*	0,28 $^{n.s}$	-	-	0,34 $^{n.s}$	0,02 $^{n.s}$
Acidez		0,04 $^{n.s}$	0,24 $^{n.s}$	0,43*	0,07 $^{n.s}$	-0,02 $^{n.s}$
Gordura			-	0,44*	-0,04 $^{n.s}$	0,13 $^{n.s}$
EST				-	0,15 $^{n.s}$	0,10 $^{n.s}$
ESD					0,32 $^{n.,s}$	0,02 $^{n.s}$
Lactose						0,15 $^{n.s}$

$^{n.s}$ Não significativo, * P<0,01

No que se refere à composição lipídica, foram identificados e quantificados 24 ácidos graxos, dos quais 11 eram saturados, seis monoinsaturados e sete poliinsaturados (Tabela 3), os quais representaram 77,7%, 20% e 2,3%, respectivamente, do total de ácidos graxos presentes no leite. Estudos realizados com cabras leiteiras mostraram valores semelhantes aos encontrados no presente estudo. Queiroga et al. (2007), trabalhando com cabras da raça Saanen, e Strzałkowska et al. (2009) com a Branca Polonesa, relataram, respectivamente, de 75,9% e 77,65% de ácidos graxos saturados; 21,9% e 19,52% de monoinsaturados e 2,2% e 2,8% de poliinsaturados. Analisando esses achados de maneira conjunta, verifica-se que, além da predominância dos ácidos graxos saturados, proporção próxima de 78:20:2 para saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, parece ser uma característica inerente à espécie caprina.

Dentre os ácidos graxos saturados, o ácido palmítico (C16:0) foi o mais predominante, com teor de 29,26±2,88% dos monoinsaturados; o ácido oléico *cis* (C18:1n-9c), com 17,91±2,96% e dos poliinsaturados; o ácido linoleico (C18:2n-6c), com 1,17±0,12% do total de ácidos graxos. Esses três ácidos graxos juntos, considerando as formas *cis e trans* do oleico e linoleico, totalizaram 49,82%, valor próximo ao encontrado por Alonso et al. (1999) de 50,69%, no leite de cabras espanholas. No entanto, considerando apenas o oleico (C18:1n-9c) e linoleico (C18:2n-6c) *cis*, a representatividade foi de 48,35%.

Ao longo do período de 90 dias da lactação, as concentrações de cada ácido graxo sofreram variações (P<0,05). Os maiores percentuais de ácidos graxos saturados ocorreram no 30° dia da lactação, enquanto que os ácidos graxos insaturados (mono e poliinsaturados) apresentaram os maiores percentuais aos 45 e 60 dias da lactação (Tabela 3).

Variações no perfil de ácidos graxos em diferentes fases de lactação também foram verificadas por Queiroga et al. (2007) em cabras da raça Saanen, com os maiores percentuais de ácidos graxos saturados na fase intermediária da lactação e de ácidos graxos insaturados na fase inicial da lactação. Soryal et al. (2004), trabalhando com cabras Alpinas, destacaram que, com o avanço da lactação, o conteúdo de ácidos graxos saturados e insaturados oscilaram acentuadamente. Valores mais elevados de ácidos graxos saturados foram encontrados no início e no final da lactação em cabras Nubianas e Alpinas (SORYAL et al., 2005).

Quanto aos ácidos graxos saturados de cadeia curta, em especial o caproico (C6:0), caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0), embora tenham apresentado oscilações (14,23% e 22,81% no 60º e no 75º dia, respectivamente, $P<0,05$), a concentração média durante o período de 90 dias de lactação foi de 17,75±3,19% (Tabela 3).

A concentração dos ácidos graxos caproico, caprílico e cáprico é um dado relevante, uma vez que esses ácidos influenciam o aroma e sabor do leite e de seus derivados (EKNAES et al., 2009), servindo inclusive como parâmetro para detectar adulterações ocasionadas por misturas de leite de outras espécies (PARK et al., 2007). Haenlein (2004) ainda destaca que esses ácidos, muito embora sejam saturados, apresentam a particularidade de serem fontes de energia sem acúmulo no tecido adiposo e por isso têm sido recomendados em tratamentos de desnutrição infantil e síndrome de má absorção.

Embora Cenachi et al. (2011) reportaram que os ácidos graxos C6:0, C8:0 e C10:0 constituem aproximadamente 20% do total de ácidos graxos presentes no leite de cabra, parece haver variações entre os grupos genéticos. Enquanto Strzałkowska et al. (2009) relataram valores mínimos e máximos de 24,38% e 29,22% em cabras da raça Branca Polonesa, Fernandes et al. (2008) descreveram 14,77% no leite de cabras mestiças Moxotó.

Considerando que a maior concentração de ácidos graxos de cadeia curta pode ser um fator limitante do consumo, devido ao característico aroma e sabor, o leite de cabra nativa pode se constituir em uma alternativa comercial por apresentar menores teores de C6:0, C8:0 e C10:0.

Tabela 3 - Concentrações (%) dos ácidos graxos presentes no leite de cabras nativas criadas em sistema extensivo na Caatinga, em diferentes momentos de lactação.

Ácidos graxos / Dias de Lactação	Concentração %						(EP)
	15	30	45	60	75	90	
C 4:0	0,78 ^{b}	1,36 ^{a}	0,81 ^{b}	0,48 ^{c}	1,05 ^{b}	0,33 ^{c}	0,15
C 6:0	2,62 ^{bc}	3,11 ^{ab}	2,67 ^{bc}	1,98 ^{d}	3,31 ^{a}	2,45^{cd}	0,19
C 8:0	3,05 ^{b}	3,44 ^{b}	3,24 ^{b}	2,86 ^{b}	4,85 ^{a}	2,81^{b}	0,31
C 10:0	11,62 ^{ab}	13,66 ^{a}	10,51 ^{b}	9,39 ^{b}	14,65 ^{a}	10,29 ^{b}	0,84
C 12:0	3,83 ^{bc}	5,43 ^{a}	3,76 ^{bc}	2,75 ^{c}	4,79 ^{ab}	4,23^{ab}	0,38
C 13:0	0,05 ^{c}	0,05 ^{c}	0,11 ^{ab}	0,09 ^{b}	0,06 ^{c}	0,12^{a}	0,01
C 14:0	10,88 ^{ab}	11,65 ^{a}	9,22 ^{b}	10,58 ^{ab}	11,03 ^{ab}	12,12 ^{a}	0,41
C 15:0	1,08 ^{a}	1,24 ^{a}	1,29 ^{a}	1,19 ^{a}	0,71 ^{b}	1,34 ^{a}	0,09
C 16:0	32,10 ^{a}	31,72 ^{ab}	26,86 ^{bc}	31,18 ^{ab}	25,09 ^{c}	28,59 ^{abc}	1,17
C 17:0	0,76 ^{c}	0,72 ^{c}	1,07 ^{b}	1,07 ^{b}	0,59 ^{c}	1,71^{a}	0,16
C 18:0	13,62 ^{ab}	9,75 ^{c}	15,05 ^{a}	12,78 ^{abc}	13,79 ^{ab}	11,05 ^{bc}	0,79
C 14:1	0,20 ^{b}	0,13 ^{c}	0,21 ^{b}	0,20 ^{b}	0,14 ^{c}	0,32 ^{a}	0,03
C 15:1	0,14 ^{c}	0,13 ^{c}	0,24 ^{ab}	0,21 ^{b}	0,16 ^{c}	0,26 ^{a}	0,02
C 16:1	0,05 ^{d}	0,21^{a}	0,12 ^{c}	0,16 ^{b}	0,03^{d}	0,10 ^{c}	0,03
C 17:1	0,23 ^{bc}	0,26 ^{ab}	0,34 ^{a}	0,33 ^{a}	0,16 ^{c}	0,25 ^{ab}	0,03
C 18:1n-9t	0,79 ^{cd}	1,09 ^{bc}	1,65 ^{a}	1,19 ^{b}	0,68 ^{d}	1,74 ^{a}	0,18
C 18:1n-9c	16,33 ^{bc}	13,64 ^{c}	20,36 ^{ab}	21,56 ^{a}	16,43 ^{bc}	19,18 ^{ab}	1,21
C 18:2n-6t	0,26 ^{bc}	0,32 ^{b}	0,19 ^{c}	0,23 ^{c}	0,18 ^{c}	0,50 ^{a}	0,05
C 18:2n-6c	1,16 ^{a}	1,39 ^{a}	1,19 ^{a}	1,06 ^{a}	1,18 ^{a}	1,08 ^{a}	0,05
C 18:3n-6c	0,03 ^{a}	0,03 ^{a}	0,04 ^{a}	0,02 ^{a}	0,02 ^{a}	0,10 ^{a}	0,01
C 18:3n-3c	0,39 ^{b}	0,52 ^{a}	0,43 ^{b}	0,41^{b}	0,19 ^{c}	0,17 ^{c}	0,06
C 18:2 9c 11t	0,23^{d}	0,36 ^{c}	0,57 ^{a}	0,43 ^{b}	0,06 ^{e}	0,10 ^{e}	0,08
C18:2 10t 12c	0,08^{a}	0,02 ^{d}	0,04 ^{c}	0,03 ^{cd}	0,03 ^{cd}	0,05 ^{b}	0,01
C 20:3n-3	0,06 ^{bc}	0,05 ^{c}	0,08 ^{b}	0,11^{a}	0,05 ^{bc}	0,13 ^{a}	0,01

EP = Erro padrão
Dia zero = dia do parto;
Valores com letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste Duncan (P<0,05).

Os maiores percentuais de ácido láurico (C12:0) e mirístico (C14:0) ocorreram nos dias de lactação 30 (5,43%) e 90 (12,12%), respectivamente. Enquanto que a maior e menor concentração do ácido palmítico (C16:0) ocorreram no 15º (32,10%) e 75º (25,09%) dia de lactação (P<0,05). O C16:0 foi o ácido graxo encontrado em maior concentração nas amostras avaliadas ao longo da lactação, representando 29,3% do total de ácidos graxos encontrados. Ressalta-se que a concentração elevada de ácido palmítico é comum na maioria das especies mamíferas, não sendo, portanto, uma particularidade da espécie caprina (STRZAŁKOWSKA et al., 2009).

Muito embora, do ponto de vista da nutricêutica, dietas ricas em ácidos graxos láurico, mirístico e palmítico são reconhecidas como hipercolesterolêmicas, uma vez que elevam os níveis de LDL e reduzem os níveis de HDL (BERNER, 1993), as maiores proporções de ácidos graxos de cadeia curta (C4 - C10) e de cadeia média (C12:0 e C14:0) possibilitam maior digestibilidade do leite caprino em comparação ao leite bovino (PARK, 1994). Isso é devido à ação mais completa e mais rápida das lipases sobre as ligações éster desses ácidos, quando comparada aos ácidos graxos de cadeia longa (SANZ SAMPELAYO et al., 2007).

Em estudo realizado por Queiroga et al. (2007), esses três ácidos graxos representaram 38,06% em leite de cabra da raça Saanen. No presente estudo, o valor médio encontrado foi de 44,30±3,42%, apresentando os menores percentuais no 45° dia de lactação, 39,84, sendo ideal que estes teores sejam os menores possíveis (COSTA et al., 2008).

Os maiores percentuais de ácido esteárico (C18:00) foi encontrado no 45° dia (15,05%), sendo que o valor médio em 90 dias de lactação (12,67±1,95) foi próximo aos 12,42±3,68%, verificado por Queiroga et al. (2007). Diferentemente dos demais ácidos graxos saturados, o C18:0 parece não ter efeito hipercolesterolêmico, uma vez que ao ser metabolizado é transformado em ácido oleico que, ao contrário do C18:0, tem efeito hipocolesterolêmico (COSTA et al., 2008).

O ácido oleico *trans* (C18:1n-9t) apresentou valor médio de 1,19±0,43%, enquanto que, para o oleico *cis* (C18:1n-9c), foi de 17,91±2,96%. Estudos realizados por Strzałkowska et al. (2009) mostraram percentuais médios de 2,35±0,71% para o ácido oleico *trans* e de 18,28±1,66% para o oleico *cis*. Esses ácidos se destacam por apresentarem propriedades de redução de colesterol (BERNER, 1993), sendo nutricionalmente desejáveis percentuais de 18 a 23% (CHILIARD et al., 2001), faixa em que se enquadram os teores encontrados em cabras nativas.

O teor dos ácidos graxos das famílias ômega-6 (n-6) e ômega-3 (n-3), representados pelos ácidos linoleico (18:2n-6c); gama-linolênico (C18:3n-6c); alfa-linolênico (C18:3n-3c) e di-homo-alfa linolênico (C20:3n-3) foi em média 9,89±3,16%. Os ácidos graxos linoleico e alfa-linolênico são considerados como essenciais, pois diferentemente dos demais das famílias ômega-3 e ômega-6 não são sintetizados pelo organismo, devendo, portanto, serem obtidos por meio da alimentação (CALDER, 2003).

O ácido linoleico conjugado (CLA) cis-9 trans-11 (C18:2 9c 11t) sofreu influência do período de lactação, apresentando os maiores percentuais no 45° dia (0,57%). Para o isômero (C18:2 10t 12c), os maiores percentuais ocorreram no 15° da lactação (0,08%). No presente estudo, o percentual médio dos dois isômeros nos dias de lactação avaliados foi de 0,33±0,19%, valores superiores aos encontrados por Strzałkowska et al. (2009), de 0,24 ±0,14%.

A concentração de CLA está relacionada com o teor da gordura, uma vez que o CLA presente do leite é proveniente da biohidrogenação ruminal do ácido linoleico (C18:2n-6) e da atividade da enzima Δ^9-dessaturase nas células da glândula mamária, que transformam o ácido vacênico (18:1n-7) absorvido da corrente sanguínea em CLA (BAUMAN; GRIINARI, 2001).

Diversos aspectos fisiológicos benéficos dos isômeros do CLA têm sido relatados (COSTA et al., 2009), incluindo efeito anticarcinogênico do isômero C18:2 9c 11t (HAENLEIN, 2004), imunomodulação e antiaterosclerose do isômero C18:2 10t12c (FUENTE et al., 2006; BELURY, 2002).

A quantidade relativa de ácidos graxos no leite depende do volume secretado, regulado pelos processos de síntese/captação destes ácidos (QUEIROGA et al., 2007).

Na fase inicial da lactação, o balanço energético negativo, resultante da incapacidade da matriz ingerir quantidade de alimento suficiente para equilibrar os requerimentos impostos pela produção de leite, provoca a mobilização da reserva de gordura, levando ao ingresso de triglicerídeos na circulação sanguínea, aportando ácidos graxos de cadeia longa à célula mamária, assim como, promovendo redução no balanço dos ácidos graxos insaturados (GONZÁLEZ et al., 2001).

A despeito das oscilações no teor dos ácidos graxos verificado ao longo da lactação, não foi verificada correlação entre os dias de lactação e o teor de ácidos graxos no presente estudo.

3.4 CONCLUSÕES

Os aspectos físico-químicos (acidez titulável, densidade, gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado) do leite de cabras nativas criadas em sistema extensivo da caatinga apresentam variações significativas ao longo da lactação;

O leite de cabras nativas apresenta predominância de ácidos graxos saturados, mantendo ao longo da lactação uma proporção média de 78:20:2 para ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, respectivamente;

Considerando as variações físico-químicas do leite de cabras nativas, as quais constituem o maior efetivo de matrizes do rebanho nacional, os valores de referência estabelecidos pela legislação brasileira para densidade, gordura e extrato seco desengordurado devem ser reavaliados.

REFERÊNCIAS

ALONSO, L.; FONTECHA, J.; LOZADA, L.; FRAGA, M. J., JUAREZ, M. Fatty acid composition of caprine milk: major, branched chain and trans fatty acids. **Journal Dairy Science**, v. 82, n. 5, p. 878-884. 1999.

AGANGA, A. A.; AMARTEIFIO, J.O.; NKILE, N. Effect of stage of lactation on nutrient composition of Tswana sheep and goat's milk. **Journal of Composition and Analysis**, v. 15, n. 5, p. 533-543, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 16.ed. 4.rev. Washington: 1998. 2v. 1018p.

BANNON, C. D.; BREEN, G. J.; CRASKE, J. D.; HAI, N. T.; HARPER, N. L.; O´ROURKE, K. L. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. **Journal of Chromatography**, v. 247, p. 71-89, 1982.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat low-fat milk síndrome. **Livestock Production Science**, v. 70, p. 15-29. 2001.

BELURY, M. A. Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological Effects and Mechanisms of Action. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 505-31, 2002.

BERNER, L. A. Defining the role of milk fat in balanced diets. **Advances in Food and Nutrition Research**. v. 37, p. 131-257. 1993.

BOZA, J.; SANZ SAMPELAYO, M. R. Aspectos nutricionales de la leche de cabra. Anales de la Academia **Ciencias Veterinárias de Andalucia Oriental**, v.10, p.109-139, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. Instrução Normativa nº 37 de 31 de outubro de 2000**. Diário Oficial da União, Brasília, 8 de novembro de 2000.

CALDER, P. C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 4, p. 433-446, 2003.

CENACHI, D. B.; FURTADO, M. A. M.; BELL, M. J. V.; PEREIRA, M. S.; GARRIDO, A.; PINTO, M. A. DE O. Aspectos composicionais, propriedades funcionais, nutricionais e sensoriais do leite de cabra: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 382, p. 12-20, 2011.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; DOREAU, M. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. **Livestock Production Science**, v. 70, p. 31-48. 2001.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; ROUEL, J.; LAMBERET, G. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. **Journal of Dairy Science,** v.86, p.1751–1770, 2003.

COSTA, R. G.; MESQUITA, I. V. U.; QUEIROGA, R. DE C. R. DO E.; MEDEIROS, A. N. DE, CARVALHO, F. F. R. DE, FILHO, E. M. B. Características químicas e sensoriais do leite de cabras Moxotó alimentadas com silagem de maniçoba. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 4, p.694-702, 2008.

COSTA, R. G.; QUEIROGA, R. DE C. R. E.; PEREIRA, R. A. G. Influência do alimento na produção e qualidade do leite de cabra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 307-321, 2009.

COSTA, E. N.; LACERDA, E. C. Q.; SANTOS, S. M. S.; SANTOS, C. M. S.; FRANCO, M.; SILVA, R. R.; SIMIONATO, J. I. Action of successive heat treatments in bovine milk fatty acids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 11, p. 2115-2120, 2011.

EKNAES M.; HAVREVOLL O.; VOLDEN H., HOVE K. Fat content, fatty acid profile and off-flavours in goats milk – effects of feed concentrates with different fat sources during the grazing season. **Animal Feed Science and Technology**, v. 152, p. 112-122, 2009.

FEKADU, B.; SORYAL, K.; ZENG, S.; VAN HEKKEN, D.; BAH, B.; VILLAQUIRAN, M. Changes in goat milk composition during lactation and their effect on yield and quality of hard and semi-hard cheeses. **Small Ruminant Research**, v. 59 p. 55-63, 2005.

FERNANDES, M. F.; QUEIROGA, R. DE C. R. DO E.; MEDEIROS, A. N. DE; COSTA, R. G.; BOMFIM, M. A. D.; BRAGA, A. A. Características físico-químicas e perfil lipídico do leite de cabras mestiças Moxotó alimentadas com dietas suplementadas com óleo de semente de algodão ou de girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 4, p. 703-710, 2008.

FERREIRA, M. C. C; QUEIROGA, R. C. R. E. Composição química do leite de cabras puras no Curimataú paraibano durante o período de lactação. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v. 58, n. 330, p. 21-26, 2003.

FUENTE, M.A. de la; LUNA, P.; JUAREZ, M. Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 917-926, 2006.

GOMES, V.; LIBERA, A. M. M. P. D.; MADUREIRA, K. M.; ARAÚJO W. P. Influência do estágio de lactação na composição do leite de cabras (*Capra hircus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 339-342, 2004.

GONZALEZ, F. H. D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: GONZALEZ, F. H. D.; DURR, J. W.; FONTANELI, R. S. (ed.) Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre: UFRGS, p. 5-22, 2001.

GREYLING, J. P. C.; MMBENGWA, V. M.; SCHWALBACH, L. M. J.; MULLER, T. Comparative milk production potential of indigenous and Boer goats under two feeding systems in South Africa. **Small Ruminant Research**, v. 55, p. 97-105, 2004.

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutricion. **Smal Ruiminant Research**. v. 51, p. 155-163, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 4 ed., 1 Edição Digital. 1985. 533p.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET. **Relatório de dados diários por ano**. 4º Distrito de Meteorologia, 2006.

LACERDA, E. C. Q. **Efeito da inclusão de orégano na dieta de vacas leiteiras sobre a qualidade do leite.** 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga.

MESTAWET, T. A.; GIRMA, A.; ÅDNØY, T.; DEVOLD, T. G.; NARVHUS, J. A.; VEGARUD, G. E. Milk production, composition and variation at different lactation stages of four goat breeds in Ethiopia. **Small Ruminant Research**, v. 105 p.176-181, 2012.

MORAND-FEHR, P. Recent developments in goat nutrition and application: A review. **Small Ruminant Research**, v. 60, p. 25-43, 2005.

PARK, Y. W. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 14, p. 151-161, 1994.

PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 88-113, 2007.

PRASAD, H.; SENGAR, O. P. S. Milk yield and composition of the Barbari gota breed and its cross with Jamunapari, Beetal and Black Bengal. **Small Ruminant Research** , v. 45, p. 79-83, 2002.

QUEIROGA, R. C. R. E.; COSTA, R. G.; BISCOTINI, T. M. B.; MEDEIROS, A. N.; MADRUGA, M. S.; SCHULER, A. R. P. Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite de cabras Saanen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 430-437, 2007.

REVENEAU, C. **Dietary source and availibility of fatty acids to manipulate ruminal protozoa, metabolism of fat, and milk fatty acid profile in lactating dairy cows**. 2008, 152 f. Tese (Doutorado), Ohio State University.

ROTA, A. M.; RODRÍGUEZ, P.; ROJAS, A.; MARTIN, L.; TOVAR, J. Evolucion de la cantidad y calidad de la leche de cabra Verata a lo largo de la lactacion. **Archivos de Zootecnia**, v. 42, n. 157 p. 137-146, 1993.

STRZAŁKOWSKA, N.; JÓŹWIK, A.; BAGNICKA, E.; KRZYŻEWSKI, J.; HORBAŃCZUK K.; PYZEL B.; HORBAŃCZUK, J. O. Chemical composition, physical traits and fatty acid profile of goat milk as related to the stage of lactation. **Animal Science Papers and Reports**, v. 27, n. 4, p. 311-320, 2009.

SANZ SAMPELAYO, M.R.S.; CHILLIARD, Y.; SCHMIDELY, P. et al.Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 42-63, 2007.

SIMIONATO, J. I.; GARCIA, J. C.; DOS SANTOS, G. T.; OLIVEIRA, C. C.; VISENTAINER, J. V.; SOUZA, N. E. Validation of the Determination of Fatty Acids in Milk by Gas Chromatography. **Journal Brazilian Chemical Society,** v. 21, p. 520-524, 2010.

SORYAL, K. A.; ZENG, S. S.; MIN, B. R.; HART, S. P. Effect of feeding treatments and lactation stages on composition and organoleptic quality of goat milk Domiati cheese. **Small Ruminant Research**, v. 52, n. 1-2, p. 109-116, 2004.

SORYAL, K.; BEYENE, F. A.; ZENG, S.; BAH, B.; TESFAI, K. Effect of goat breed and milk composition on yield, sensory quality, fatty acid concentration of soft cheese during lactation. **Small Ruminant Research**, v. 5 8, p. 275-281, 2005.

CAPÍTULO II

EXCREÇÃO DE IVERMECTINA NO LEITE DE CABRAS NATIVAS [§]

RESUMO

Este estudo objetivou desenvolver e validar um método para determinação do ivermectina em amostras de leite de cabra por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e determinar a excreção de resíduos de ivermectina no leite de cabras nativas submetidas a tratamento antiparasitário. Doze cabras lactantes, pluríparas, criadas extensivamente em pastagem nativa foram selecionadas e tratadas com ivermectina. As amostras de leite foram coletadas antes e após a aplicação do medicamento (D_0, D_3, D_7, D_{14}, D_{21}, D_{28}, D_{35}, D_{42}). A detecção da ivermectina foi realizada através de sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV/VIS. A excreção do resíduo de ivermectina ocorreu de forma diferenciada em função do tempo após aplicação do fármaco. As taxas médias de decréscimo do resíduo nas amostras nos intervalos D_3-D_7; D_7-D_{14}; D_{14}-D_{21}; D_{21}-D_{28}; D_{28}-$D_{35;}$ D_{35}-D_{42} foram de 8,7%; 2,1%; 2,6%, 34,3%, 33,2% e 100%, respectivamente. No período entre o dia 3 e o dia 21 as concentrações médias de resíduos de ivermectina foram semelhantes ($P>0,05$), quando todas as amostras apresentaram valores $\geq 51,90$ μg mL^{-1}. A concentração média no D_{28} foi menor que aquelas apresentadas nos dias anteriores ($P<0,05$). No período entre o D_{28} e $D_{42,}$ as concentrações médias de ivermectina decresceram de forma gradual. No D_{42} em nenhuma amostra foi detectado resíduo de ivermectina. O método de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV/VIS é eficaz para detecção e quantificação de resíduos de ivermectina no leite caprino. O leite de cabras tratadas oralmente com ivemectina apresenta resíduos abaixo de 0,92 μg mL^{-1} aos 42 dias após o tratamento.

Palavras-chave: leite caprino, lactona macrocíclica, CLAE, resíduo.

[§] Enviado para publicação na Revista Brasileira de Zootecnia

CHAPTER II

IVERMECTIN EXCRETION IN THE MILK FROM NATIVE GOATS

ABSTRACT

This study aimed to develop and validate a method for determining ivermectin in goat milk samples by means of high-performance liquid chromatography (HPLC) and determining the excretion of ivermectin residues in the milk from native goats subjected to antiparasitic treatment. Twelve lactating, pluriparous goats raised extensively on native pasture were selected and treated with ivermectin. Milk samples were collected before and after the application of the drug (D_0, D_3, D_7, D_{14}, D_{21}, D_{28}, D_{35}, D_{42}). The detection of ivermectin was carried out by means of a high-performance liquid chromatography system provided with a UV/VIS detector. The excretion of ivermectin residue took place differently due to the time after the drug application. The average rates of residue decrease in the samples in the intervals D_3-D_7; D_7-D_{14}; D_{14}-D_{21}; D_{21}-D_{28}; D_{28}-$D_{35;}$ D_{35}-D_{42} were 8.7%; 2.1%; 2.6%; 34.3%; 33.2%; and 100%, respectively. In the period between the 3rd day and the 21st day the average concentrations of ivermectin residues were similar ($P>0.05$), when all samples showed values ≥51,90 μg mL^{-1}. The average concentration was lower on D_{28} than those showed in the earlier days ($P<0.05$). In the period between D_{28} and D_{42}, the average concentrations of ivermectin decreased gradually. On D_{42} ivermectin residue was not detected in any sample. The method of high-performance liquid chromatography provided with a UV/VIS detector is effective for detecting and quantifying the residues of ivermectin in goat milk. The milk from goats orally treated with ivermectin shows residues below 0.92 μg mL^{-1} 42 days after the treatment.

Keywords: goat milk, macrocyclic lactone, HPLC, residue.

4.1 INTRODUÇÃO

No nordeste do Brasil, assim como em outras regiões semiáridas do mundo, a caprinocultura familiar desempenha importante papel social e econômico, principalmente para a população de baixa renda, na medida em que disponibiliza o leite como fonte de proteína animal **(**KNIGHTS; GARCIA, 1997; RIBEIRO; RIBEIRO, 2001; HAENLEIN, 2004).

Do ponto de vista da segurança alimentar, a produção de leite destinado ao consumo humano deve evitar ao máximo a presença de resíduos farmacológicos que ofereçam riscos à saúde humana (ANVISA, 2006). No entanto, o uso de medicamentos em fêmeas lactantes tem sido uma prática comum para o controle de endoparasitoses (CHAGAS et al., 2007). A glândula mamária é uma importante via de excreção das moléculas endectocidas (TOUTAIN et al., 1990; FLAJS et al., 2005), sendo que alguns estudos já identificaram resíduos de ivermectina no leite bovino (TURNIPSEED et al., 2005; SOUZA et al., 2007).

A ivermectina comercial é uma combinação de dois homólogos (22,23-diidroavermectina-B1a e 22,23-diidroavermectina-B1b), constituindo-se em uma droga potente e com amplo espectro de atividade contra muitas espécies de parasitas (CROOKS et al., 1998). Devido à alta lipofilicidade, a farmacocinética da ivermectina é caracterizada por uma longa persistência no organismo, possibilitando que as concentrações nos fluidos orgânicos sejam mantidas por longos períodos, sendo que cerca de 5% da dose aplicada é excretada pelo leite (ALVINERIE et al., 1994; MCKELLAR; BENCHAOUI, 1996; LANUSSE et al., 1997).

A presença de resíduos de ivermectina no leite pode apresentar efeitos negativos sobre a saúde humana, especialmente das crianças e mulheres gestantes. Em crianças, o maior consumo de leite contaminado possibilita ultrapassar a ingestão diária aceitável de resíduos, podendo desencadear o fenômeno da resistência parasitária aos princípios utilizados (EMEA, 2004). Enquanto que em mulheres gestantes, apesar de trabalhos demonstrarem que resíduos deste fármaco não apresentam complicações maiores no primeiro trimestre da gestação (CHIPPAUX et al., 1993), estudos demonstraram que resíduos de ivermectina podem apresentar efeitos mutagênicos e/ou teratogênicos em outras espécies de mamíferos (EMEA, 2004). Neste sentido, o CODEX ALIMENTARIUS

(FAO/WHO, 1993) determina o valor de 10 μg L^{-1} como limite máximo de ivermectina no leite.

Em caprinos, embora a fração eliminada no leite alcance concentrações similares ou maiores que aquelas verificadas no plasma sanguíneo (LANUSSE et al., 2009), informações sobre a presença de resíduos de avermectinas no leite caprino é escassa (CHAGAS, 2009; DUPUY et al., 2001), sendo inexistente em caprinos naturalizados.

Assim, considerando que o leite das cabras nativas é amplamente utilizado pelas famílias de baixa renda, este estudo objetivou: a) desenvolver e validar um método para determinação do ivermectina em amostras de leite de cabra por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); (b) determinar a excreção de resíduos de ivermectina em leite de cabras nativas após tratamento antiparasitário.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta de amostras de leite

Os animais utilizados pertenciam a um rebanho composto por 240 matrizes nativas sem raça definida (SRD), criadas extensivamente em pastagem nativa. A propriedade está localizada no município de Brumado-BA (14°00'00”S, 41°26'00”O), a 422 m de altitude, clima semiárido com temperatura média de 25ºC e precipitação pluviométrica média 653 mm, distribuída em cinco meses do ano (INMET, 2006).

Para esse estudo, foram selecionadas aleatoriamente 12 cabras lactantes, pluríparas e tratadas com vermífugo a base de ivermectina (Ivomec Oral®, Merial, Brasil), na dose de 200 μg kg^{-1} de peso vivo, conforme sugerido pelo fabricante.

As amostras de leite foram coletadas antes e após a aplicação do medicamento no dia zero (antes da aplicação do fármaco), e nos dias três, sete, 14, 21, 28, 35 e 42 (D_0, D_3, D_7, D_{14}, D_{21}, D_{28}, D_{35} e D_{42}), acondicionadas em sacos plásticos descartáveis, devidamente identificados e então mantidas congeladas em freezer (-20ºC) até o momento das análises no Laboratório de Química Analítica da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB para determinação de resíduos de ivermectina.

4.2.2 Preparo das soluções analíticas e da fase móvel

Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultra pura, obtida pelo sistema de purificação (Millipore, São Paulo, SP, Brasil). As soluções analíticas de referência foram preparadas por sucessivas diluições do padrão de ivermectina (Ivermectina®, Sigma-Aldrich, EUA). Inicialmente, preparou-se 100,0 mL de solução estoque com concentração de 500 mg L^{-1} do padrão da ivermectina, a qual foi armazenada em frascos de polipropileno descontaminados (Company, Rochester, NY, USA). A partir da solução estoque, foram preparadas as soluções de trabalho em concentrações adequadas (10, 20, 40, 160, 320 e 400 mg L^{-1}) para a construção das curvas analíticas. O diluente utilizado foi uma solução composta por metanol grau CLAE (Álcool metílico UV/CLAE espectroscópico, Vetec, Brasil) e clorofórmio (Clorofórmio UV/CLAE espectroscópico, Vetec, Brasil) na proporção 30:70 v/v, respectivamente, conforme sugerido por Waldia et

al., (2008). As soluções de trabalho foram preparadas sempre no dia das análises e descartadas ao final da rotina

A fase móvel foi preparada pela adição de acetonitrila grau CLAE (Acetonitrila UV/CLAE espectroscópico, Vetec, Brasil), água Milli-Q e metanol na proporção 60:10:30 (v/v/v), respectivamente (WALDIA et al., 2008).

4.2.3 Preparação das amostras de leite, extração, detecção e quantificação do analito

Após o descongelamento das amostras, uma alíquota de 2,0 mL de leite foi transferida para um tubo de ensaio, acrescida de 2,0 mL de acetonitrila e centrifugada a 1.370 x *g*, por 5 minutos, para obtenção do extrato.

O procedimento de extração da ivermectina das amostras de leite foi realizada em três etapas: i) ativação dos cartuchos de extração em fase sólida - EFS sílica-C18 19% de carbono (500 mg.3 mL^{-1}), ii) adsorção da ivermctina ao sorvente e iii) eluição da ivermectina e iiii) lavagem do cartucho.

Para a ativação do cartucho, foram utilizados 3,0 mL de acetona e 2,0 mL de acetonitrila, com aplicação de vácuo, de modo a alcançar vazão de 3,0 mL min^{-1}. Posteriormente, para adsorção da ivermectina ao sorvente, 2 mL do extrato foi adicionado à coluna, com aplicação de vácuo, como descrito anteriormente. Para eluição da ivermectina, foram utilizados 3,0 mL de acetona. A amostra obtida foi reconstituída com 2 mL de uma mistura de acetonitrila/água/metanol 60:10:30 (v/v/v) em um balão de 5,0 mL e então filtrada com filtro de seringa de 0,22 µm. Uma vez realizada a eluição, a coluna foi lavada a vácuo, duas vezes, utilizando na primeira lavagem 4,0 mL de acetonitrila, por três minutos, e na segunda, 6,0 mL de hexano, por dois minutos.

A detecção da ivermectina foi realizada através de sistema de cromatografia líquida de alta eficiência composto de uma bomba de série 200, válvula de amostragem, *loop* de 20 µL e um detector série UV/VIS (CLAE, Perkin Elmer, USA).

Para separação cromatográfica da ivermectina, foi utilizada uma coluna de 250 x 4,5 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula (RP-C18, Thermo, USA). Cada amostra injetada em triplicata (20,0 µL) foi submetida a uma eluição isocrática, fluxo de 1,8 $mL.min^{-1}$. A detecção da ivermectina foi realizada à temperatura de 30ºC, utilizando comprimento de onda de 245 nm.

4.2.4 Validação do método analítico

Os procedimentos de validação do método de análise foram realizados com base nos parâmetros de linearidade, exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade e reprodutibilidade parcial), limite de detecção e quantificação (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003).

4.2.5 Análise estatística

Os dados quantitativos obtidos da concentração de ivermectina, nos diferentes dias de coleta, foram submetidos à ANOVA, e as médias comparadas pelo teste Tukey (SAS, versão 8.0). As diferenças foram consideradas significativas com $P<0,05$. As regressões para a curva analítica e para a curva de concentração do resíduo de ivemectina foram determinadas com $P<0,01$ (SAS, versão 8.0).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Método analítico

A curva analítica traçada por padronização da ivermectina apresentou linearidade na concentração de 10 a 400 μg mL^{-1} com coeficiente de determinação de 0,9972 (Figura 1). Tendo em vista que a linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação, de acordo com os critérios de aceitabilidade de resultados do CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO, 1993), o coeficiente de determinação da curva analítica (R^2) deve ser ≥ 0,995. A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de determinação igual a 0,98 e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90. Assim, a curva analítica para ivermectina, encontrada no presente estudo (CLAE/UV), apresenta-se dentro dos padrões de aceitabilidade dos órgãos nacionais e internacionais.

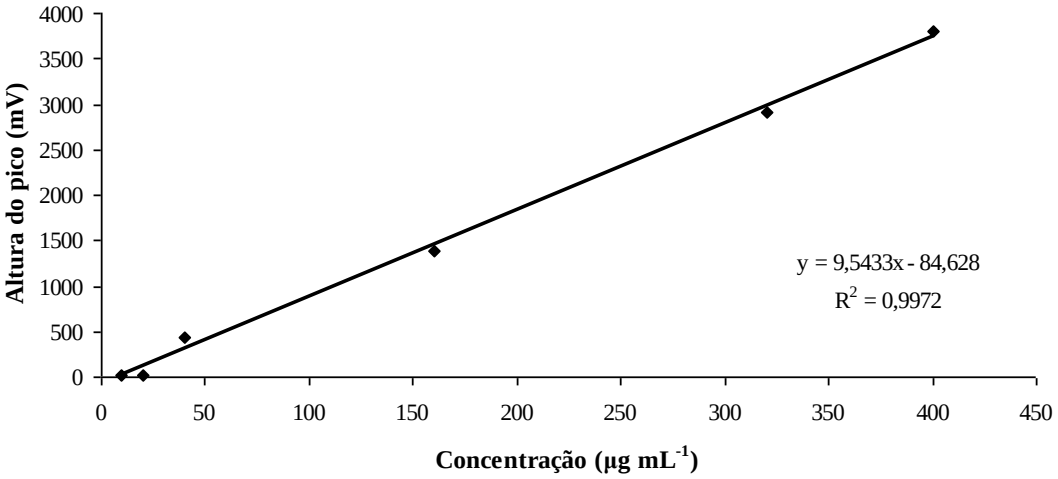


Figura 1 - Curva analítica obtida por CLAE/UV com leite caprino contendo diferentes concentrações de ivermectina.

O tempo de retenção da ivermectina nas amostras de leite de cabras nativas foi de 4,40 minutos, verificando-se concordância entre as curvas de intensidade da resposta e tempo de retenção, quando comparados aos cromatogramas obtidos com a solução padrão no tempo de 4,45 minutos, quando o pico da ivermectina apresentou resolução satisfatória, separado dos picos de interferentes (Figura 2). Para estabilização da linha de base, quando necessário, foi injetada uma solução de metanol e água na proporção de 1:1.

Souza et al. (2007), determinando resíduos em leite bovino, observaram tempo de retenção de 11,2 minutos para ivermectina, portanto, superior ao verificado no presente estudo. Ressalta-se que, no citado trabalho, diferentemente da metodologia aqui utilizada, a ivermectina foi adicionada às amostras de leite oriundo de animais não tratados, e para detecção foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. Tempo de retenção superior (6,9 minutos) para a ivermectina também foi observado por Flajs et al. (2005), em estudo de farmacocinética de avermectinas em pequenos ruminantes.

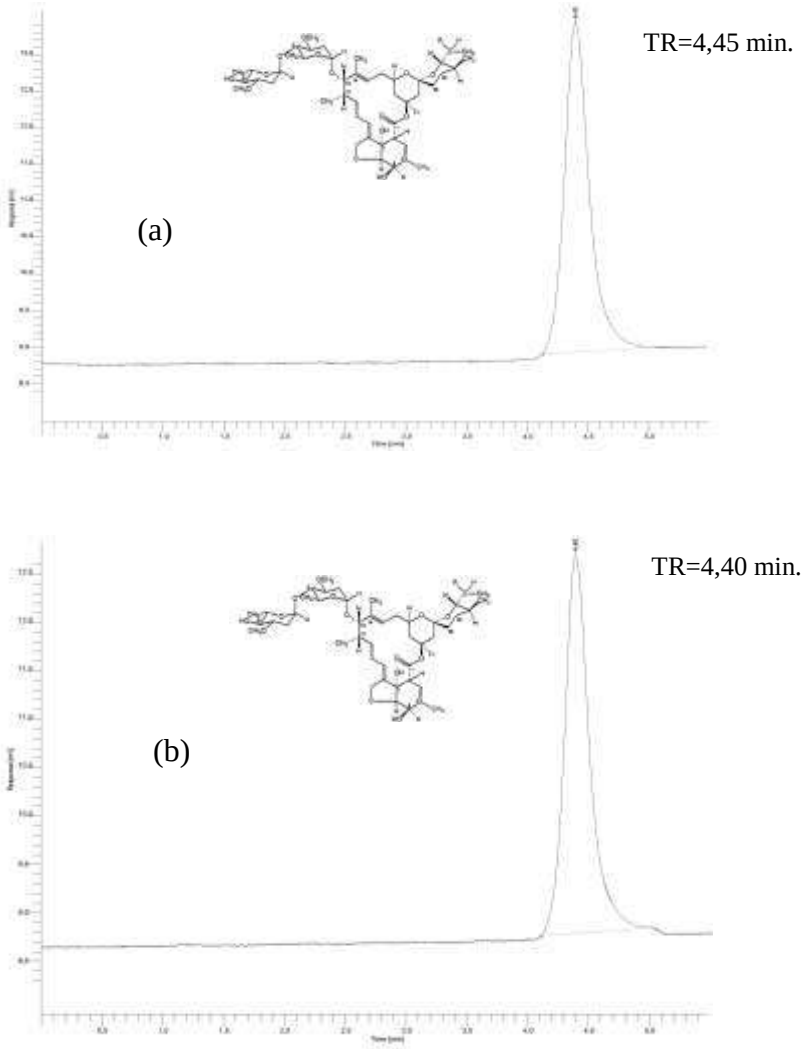


Figura 2 - Cromatogramas obtidos com a solução padrão de ivermectina (a) e com amostras de leite de cabras contendo resíduos de ivermectina (b) com os respectivos tempos de retenção (TR).

Em todas as amostras fortificadas foi detectado resíduo de ivermectina. Os valores de recuperação variaram de 87,8% a 95,5%. Para os níveis de concentração de 10, 40 e 320 μg mL^{-1}, a taxa média de recuperação foi de 92,5% (Tabela 1).

De acordo com a ANVISA (2003), a taxa de recuperação deve ser próxima de 100%, ainda que valores menores possam ser admitidos, desde que a recuperação seja precisa e exata. Em trabalhos para determinação de resíduo de ivermectina na matriz leite bovino, Alvinerie et al. (1987) obtiveram taxa de recuperação média de 78,8% utilizando CLAE/UV, enquanto que Turnipseed et al. (2005), utilizando CLAE-EM, e Souza et al. (2007), utilizando CLAE-FL, obtiveram taxas de recuperação ≥60,0% e ≥84,0%, respectivamente. Ao analisar esses achados conjuntamente com os resultados obtidos, é plausível admitir que a taxa de recuperação de resíduos de lactonas macrocíclicas pode sofrer influência da matriz e/ou do método utilizado. Os valores de repetibilidade e de reprodutibilidade parcial, obtidos no presente estudo, variaram de 12,6% a 18,9% e 14,5% a 18,7%, respectivamente, com valores médios para os quatro níveis de concentração (10, 40 e 320 μg mL^{-1}) de 16,1% e 16,8%, na mesma ordem (Tabela 1). Os limites de detecção e de quantificação da ivermectina foram 0,92 μg mL^{-1} e 2,8 μg mL^{-1}, respectivamente.

Tabela 1 - Taxas de recuperação, repetibilidade e reprodutibilidade parcial do método analítico utilizado para detecção da ivermectina em leite caprino[1]

Concentração (μg mL^{-1})	**Recuperação (%)**	**Repetibilidade (%)[2]**	**Reprodutibilidade parcial (%)[2]**
10	95,5	16,8	14,5
40	87,8	12,6	18,7
320	94,2	18,9	17,2

[1] Acrescido de solução padrão de ivermectina; [2] Valores expressos em desvio padrão relativo.

Na matriz leite bovino, Souza et al. (2007) obtiveram valores de repetibilidade ≤ 14,7 e de reprodutibilidade parcial ≤ 22% para resíduo de ivermectina. Embora seja recomendável que os valores de repetibilidade e reprodutibilidade parcial não devem exceder 15% (ANVISA, 2003), o valor máximo aceitável deve ser definido em função da metodologia empregada, concentração do analito na amostra, matriz e da finalidade do método. Esses mesmos autores, utilizando CLAE-FL, obtiveram limites de detecção e de quantificação de avermectinas de 5 μg L^{-1} e 10 μg L^{-1}, respectivamente.

Considerando que os valores de precisão (repetibilidade e de reprodutibilidade parcial) foram expressivos nas diferentes concentrações do analito, e ainda que a taxa de recuperação assim como os limites de detecção e de quantificação apresentaram-se dentro

dos limites recomendados, o método analítico utilizado no presente estudo mostrou-se adequado para determinação de resíduo de ivermectina em leite caprino.

4.3.2 Resíduo de ivemectina no leite de cabras nativas

A excreção da ivermectina no leite ocorreu de forma diferenciada, em função do tempo, após aplicação do fármaco. As taxas de decréscimo do resíduo nas amostras subsequentes, nos intervalos D_3-D_7; D_7-D_{14}; D_{14}-D_{21}; D_{21}-D_{28}; D_{28}-D_{35}; D_{35}-D_{42}, foram de 8,7%; 2,1%; 2,6%, 34,3%, 33,2% e 100%, respectivamente (Figura 3).

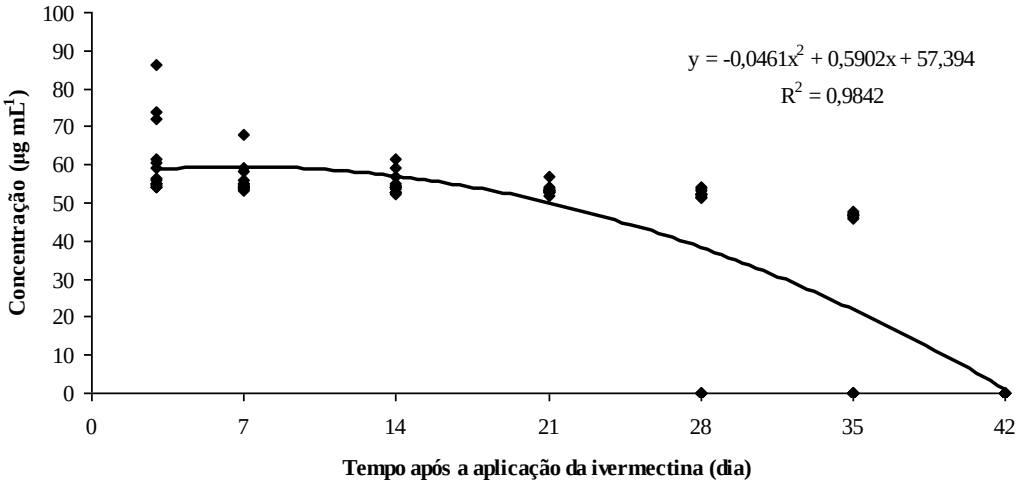


Figura 3 - Curva de concentração do resíduo de ivermectina no leite de cabras nativas tratadas.

No período entre o dia 3 e o dia 21, as concentrações médias de ivermectina foram semelhantes ($P>0,05$), quando todas as amostras apresentaram valores $\geq 51,90$ µg mL^{-1}. A concentração média no D_{28} foi menor que aquelas apresentadas nos dias anteriores ($P<0,05$). No período entre o D_{28} e D_{42}, as concentrações médias de ivermectina decresceram de forma gradual. No D_{28}, 33,3% das amostras apresentaram valores <0,92 µg mL^{-1} (limite de detecção) e 66,6% apresentaram valores $\geq 51,40$ µg mL^{-1}. No D_{35}, embora em 50% das amostras não tenha sido detectado resíduo, nas outras 50% as concentrações foram $\geq 45,93$ µg mL^{-1}. No D_{42} em nenhuma amostra foi detectado resíduo de ivermectina (Tabela 2).

Apesar da concentração média de ivermectina ter decrescido aos 28 e 35 dias após aplicação do fármaco, com diferenças expressivas, quando comparada aos dias anteriores,

as concentrações de ivermectina em todos os dias avaliados, considerando as amostras que apresentaram acima do limite de detecção, foram próximas a 55 μg mL^{-1}, este fato pode ser explicado devido ao caráter lipofílico da molécula de ivermectina, persistindo no organismo por longos períodos. A lipofilicidade da molécula explica, em parte, a queda brusca das concentrações, já que a ivermectina se liga à gordura, sendo liberada lentamente, uma vez que a reserva de gordura se euxari, a concentração do fámaco descrece abaixo do limite de detecção.

Tabela 2 - Resíduos de ivermectina encontradas no leite de cabras nativas no período de 42 dias após aplicação do fármaco.

Animais/Tempo	Concentração de ivermectina (μg mL^{-1})						
	3	7	14	21	28	35	42
1	59,05	53,75	54,22	53,65	53,00	47,32	<0,92
2	71,82	59,25	59,12	52,92	<0,92	<0,92	<0,92
3	86,30	55,05	53,57	53,35	<0,92	<0,92	<0,92
4	55,20	54,87	52,40	51,90	51,40	47,63	<0,92
5	54,17	54,10	52,90	52,60	52,47	47,00	<0,92
6	60,40	58,17	56,77	53,02	51,50	45,93	<0,92
7	54,15	53,72	53,98	53,23	52,20	46,62	<0,92
8	54,45	53,07	52,90	53,97	<0,92	<0,92	<0,92
9	73,82	67,87	61,50	56,92	53,65	46,85	<0,92
10	56,02	54,22	53,95	53,77	52,50	<0,92	<0,92
11	56,20	54,62	54,45	53,17	<0,92	<0,92	<0,92
12	54,85	54,00	52,67	52,72	54,32	<0,92	<0,92
Média	$61,37 \pm 10,4^{A}$	$56,06 \pm 4,2^{A}$	$54,87 \pm 2,8^{A}$	$53,44 \pm 1,2^{A}$	$35,09 \pm 25,9^{B}$	$23,45 \pm 24,3^{C}$	<0,92

Valores seguidos de letra diferente diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).
0,92 – Valor do limite de detecção

A quantidade média diária de ivermectina excretada pelo leite foi de 0,37% do total da dose administrada. Esse valor foi inferior aos 0,7%, descrito por Cerkvenik et al. (2002) em leite de ovelha, mas próxima aos 0,31%, verificados em leite caprino (ALVENIERE et al., 1993). Embora 2% das moléculas lactonas macrocíclicas administradas sejam eliminadas pela urina (CHIU, 1990), a maior parte é excretada na forma inalterada pelas fezes (CHIU, 1990; AYRES; ALMEIDA, 2002).

A metabolização da ivermectina parece ocorrer de maneira diferenciada nas diferentes espécies, haja vista que o tempo de excreção no leite na espécie caprina foi maior que nas espécies bovina (ALVENIERE et al., 1987) e ovina (CERKVENIK et al., 2002), nas quais os tempos de excreção foram de 21 e 23 dias, respectivamente.

Por outro lado, a estrutura química da molécula também interfere na metabolização, uma vez que o tempo de excreção da doramectina foi maior que o da ivermectina (37 vs 23 dias) no leite ovino (FLAJS et al., 2005). Enquanto que o tempo de excreção da

eprinomectina no leite bovino (ALVENIERE et al., 1999) e caprino (DUPUY et al., 2001) foi relativamente semelhante (em torno de 15 dias).

A maior concentração de ivermectina foi verificada em um animal no D_3 (86,30 μg mL^{-1}), sendo que este mesmo animal apresentou valores semelhantes aos demais no período entre D_7 e D_{21}. Por outro lado, o animal que apresentou a segunda maior concentração no D_3 (73,82 μg mL^{-1}) permaneceu com concentrações maiores até o D_{21}, quando apresentou valor semelhante aos demais (Tabela 2).

A flutuação das concentrações de ivermectina em função do tempo pode ser consequência de variações individuais nos processos de síntese e secreção do leite (CERKVENIK et al., 2002). De acordo com Flags et al. (2005), essas diferenças podem ser atribuídas a diferenças na velocidade de absorção do fármaco, condição metabólica e composição corporal do animal. Considerando que a fração de ivermectina eliminada através do leite pode também ser influenciada pelo seu teor de gordura (LANUSSE et al., 2009), as marcantes diferenças individuais verificadas no presente estudo podem ter sido devido à diversidade genética das cabras nativas.

Por outro lado, embora o metabolismo individual tenha provocado dispersão dos valores de excreção no momento inicial, verificou-se que os animais tenderam a um padrão de excreção do resíduo no período entre D_7 e D_{21}. As amplitudes das amostras no D_3, D_7, D_{14} e D_{21} foram 32,15; 14,8; 9,10 e 5,02 μg mL^{-1}, respectivamente. Essa tendência de padronização do perfil de excreção foi verificada também nos animais que permanecerem excretando ivermectina nos dias 28 e 35, cujas amplitudes foram de 2,92 e 1,70 μg mL^{-1}, respectivamente.

4.4 CONCLUSÕES

O método de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV/VIS é eficaz para detecção e quantificação de resíduos de ivermectina no leite caprino, uma vez que o limite de detecção e quantificação é significativamente inferior ao limite máximo de resíduo aceitável pelos órgãos oficiais de saúde.

O leite de cabras tratadas oralmente com ivemectina apresenta resíduos abaixo de 0,92 $\mu g\ mL^{-1}$ aos 42 dias após o tratamento, concentração expressivamente inferior ao limite máximo aceitável, recomendado pelos órgãos oficiais de saúde, não havendo, portanto, limitações legais para o seu consumo.

REFERÊNCIAS

AYRES, M. C. C.; DE ALMEIDA, M. A. O. **Agentes antinematódeos**. In: SPINOSA, H. S., GORNIAK, S. L. e BERNARDI, M. M. Farmacologia aplicada à veterinária. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 475-489.

ALVINERIE M.; SUTRA J. F.; GALTIER P.; TOUTAIN P. L. Determination of ivermectin in milk by high performance liquid chromatography. **Ann Rech vét**. v. 18, p. 269-274, 1987.

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

ALVINERIE, M.; SUTRA,J.F.; GALTIER, P; TOUTAIN, P. L. Microdose d`ivermectine chez la vache laitiere: concentrations plasmatiques et residus dan lê lait. **Revue Medicine Veterinare**, v. 169, p. 259-261, 1994.

ALVINERIE, M.; LACOSTE, E.; SUTRA, J. F.; CHARTIER, C. Some Pharmacokinetic Parameters of Eprinomectin in Goats following Pour-on Administration. **Veterinary Research Communications**, v. 23, p. 449-455,1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Resolução 899,** de 29/05/2003, que trata da validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Brasília, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de origem animal – PAMVet. **Relatório 2004/2005: monitoramento de resíduo em leite exposto ao consumo**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/pamvet/. Acesso em: 10/03/2009.

CERKVENIK, V.; GRABNAR, V.; SKUBIC, V.; DOGANOC, D.Z.; BEEK, W.M.J.; KEUKENS, H.J.; KOSOROK, M.D.; POGACNIK, M. Ivermectin pharmacokinetics in lactating sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 104, p. 175-185, 2002.

CHAGAS, A. C. S.; VIEIRA, L. S.; ARAGÃO, W. R.; NAVARRO, A. M. C.,VILLELA, L. C. V. Anthelmintic action of eprinomectin in lactating Anglo-Nubian goats in Brazil. **Parasitol Research**, v. 100, p. 391-394, 2007.

CHAGAS, A. C. S. Resíduos de anti-helmínticos no leite de caprinos. In: CAVALCANTE, L. S., CHAGAS, A.C. S.,MOLENTO, M.B. Ed(s). **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009, p. 481-503.

CHIPPAUX, J.; GARDON-WENDEL, N.; GARDON, J.; ERNOUID, J. Absence of any adverse effect of inadvertent ivermectin treatment during pregnancy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.87, n.3, p.318, 1993.

CHIU, S. H. L.; GREEN M. L.; BAYLIS, F. P.; ELINE, D.; ROSEGAY A.; MERIWETHER, H.; JACOB, T.A. Absorption, tissue distribution and excretion of tritium-labeled ivermectin in cattle, sheep and rat. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, v. 38, p. 2072-2078, 1990.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JEFCA). Codex Alimentarius Comission. **Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food**. 1993.

CROOKS, S. R. H.; BAXTER, A. G.; TRAYNOR, I. M.; ELLIOTT, C. T.; MCCAUGHEY, W. J. Detection of ivermectin residues in bovine liver using na enzyme immunoassay. **Analyst**, v. 123, p. 355-358, 1998.

DUPUY, J.; CHARTIER, C.; SUTRA, J.F.; ALVINERIE, M. Eprinomectin in dairy goats: dose influence on plasma levels and excretion im milk. **Parasitology Research**, v. 87, p. 294-298, 2001.

EMEA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. EMEA/MRL/915/04-FINAL. 2004. Disponível em: http://www.emea.europa.eu/emea. Acesso em: 05/10/2011.

FLAJS, V. C.; GRABNAR, I.; ERZEN, N. K.; MARC, I.; POZGAN, U.; GOMBA, M.; KOLAR, L.; POGACNIK, M. Pharmacokinetics of doramectin in lactating dairy sheep and suckling lambs. **Analytica Chimica Acta**, v. 529, p. 353-35, 2005.

HAENLEIN, G.F.W.; Goat milk in human nutricion. **Smal Ruiminant Research**, v. 51, p. 155-163, 2004.

NSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. rev. 1. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003. 36 p.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMETRO. **Relatório de dados diários por ano**. 4º Distrito de Meteorologia, 2006.

KNIGHTS, M.; GARCIA, G. W. The status and characteristics of the goat (*Capra hircus*) and its potential role as a significant milk producer in the tropics: A review. **Small Ruminant Research**, v. 26, p. 203-215, 1997.

LANUSSE, C.; LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; ALVAREZ, L.; SÁNCHEZ, S.; SUTRA, J.F.; GAULTIER, P.; ALVINERIE, M. Comparative plasma disposition kinetics of

ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, p. 91-99, 1997.

LANUSSE, C. E.; ALVAREZ, L. I.; LIFSCHITZ, A.L. **Princípios farmacológicos da terapia anti-helmíntica**. CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. (Eds). Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. 2009. p. 549-603.

MCKELLAR, Q. A.; BENCHAOUI, H. A. Avermectins and milbemycins. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, p. 331-351, 1996.

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

RIBEIRO, E. L. A.; RIBEIRO, H. J. S. S. Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, p. 229-235, 2001.

SOUZA, S. V. C. de; LIMA J. A.; TEODORO, J. C.; JUNQUEIRA, R. G. Validação intralaboratorial de método quantitativo para determinação múltipla de resíduos de avermectinas em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência**. Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 823-836, 2007.

TOUTAIN, P.; ALVINERIE, M.; GLATIER, P. Plasma and milk kinetic of therapeutic doses of ivermectin for dairy cows. In: SIMON, F.;LEES, P.; SEMJEN, G. (Ed.). **Veterinary Pharmacology and Therapy in food producing animals**. Budapest: University of Veterinary Science, 1990. p. 165-170.

TURNIPSEED, S. B.; ROYBAL, J. E.; ANDERSEN, W. C., KUCK, L. R. 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**, v. 529, p. 159-165, 2005.

WALDIA, A.; GUPTA, S.; ISSARANI, R.; NAGORI, B. P. Validated liquid chromatographic method for simultaneous estimation of albendazole and ivermectin in tablet dosage form. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 15, p. 617-620, 2008.

CAPÍTULO III

EXCREÇÃO DE ALBENDAZOLE NO LEITE DE CABRAS NATIVAS**

RESUMO

Esse estudo objetivou desenvolver e validar um método para determinação do albendazole em amostras de leite de cabra por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e determinar a excreção de albendazole em leite de cabras nativas após tratamento antiparasitário. Doze cabras lactantes, pluríparas, criadas extensivamente em pastagem nativa foram selecionadas e tratadas com albendazole. As amostras de leite foram coletadas antes e após a aplicação do medicamento (0, 24, 48, 72 e 96 horas). O resíduo de albendazole foi detectado através de sistema de CLAE com detector UV/VIS. A excreção do albendazole no leite ocorreu de forma diferenciada em função do tempo após aplicação do fármaco. As taxas de decréscimo do resíduo nas amostras nos intervalos de 24-48 horas; 48-72 horas; 72-96 horas após a aplicação do fármaco foram de 63,34%; 40,18% e 100% respectivamente. Setenta e duas horas após administração do fármaco 50% das amostras apresentaram concentrações $\geq$47,61 $\mu g\ mL^{-1}$ e 50% não apresentaram valores acima do limite de detecção. Em nenhuma amostra foi detectado resíduo de albendazole 96 horas após sua administração. O método de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV/VIS é eficaz para detecção e quantificação de resíduos de albendazole no leite caprino. O uso do albendazole no controle endoparasitário em cabras lactantes possibilita a presença de resíduos no leite pelo período de até 72 horas após tratamento, tecnicamente sendo liberado para consumo humano após 96 horas da sua administração.

Palavras-chave: benzimidazóis, CLAE, leite caprino, resíduo.

** Enviado para publicação na Revista Caatinga

CHAPTER III

ALBENDAZOLE EXCRETION IN THE MILK FROM NATIVE GOATS

ABSTRACT

This study aimed to develop and validate a method for determining albendazole in goat milk samples by means of high-performance liquid chromatography (HPLC) and determining the excretion of albendazole in the milk from native goats after antiparasitic treatment. Twelve lactating, pluriparous goats, raised extensively on native pasture were selected and treated with albendazole. Milk samples were collected before and after the application of the drug (0, 24, 48, 72 and 96 hours). The albendazole residue was detected by a HPLC system provided with a UV/VIS detector. The excretion of albendazole in the milk took place in a different way due to the time after the drug application. The rates of decrease in the samples of residues in the intervals of 24-48 hours; 48-72 hours; 72-96 hours after the drug application were 63.34%; 40.18%; and 100%, respectively. Seventy-two hours after the drug administration 50% of the samples showed concentrations ≥47.61 $\mu g\ mL^{-1}$ and 50% did not show any values above the detection limit. Albendazole residue was not detected in any sample 96 hours after administration. The method of high-performance liquid chromatography provided with a UV/VIS detector is effective for detecting and quantifying albendazole residues in goat milk. The use of albendazole in the endoparasite control in dairy goats enables the presence of residues in the milk over a period as long as 72 hours after treatment, being technically released for human consumption after 96 hours from its administration.

Keywords: benzimidazoles, HPLC, goat milk, residue.

5.1 INTRODUÇÃO

Nos países em desenvolvimento, o uso do leite caprino tem se tornado uma estratégia útil para combater o problema da desnutrição que, devido ao seu alto valor nutritivo, contribui com parte significativa da proteína consumida pela população de baixa renda (PARK et al., 2007). No nordeste do Brasil, o leite caprino desempenha importante papel social, uma vez que é comumente utilizado como base alimentar pelas famílias rurais (RIBEIRO; RIBEIRO, 2001).

No entanto, embora a produção de leite destinado à comercialização deva evitar ao máximo a presença de resíduos farmacológicos que ofereçam riscos à saúde humana (ANVISA, 2006), a administração de fármacos voltados para ao controle de endoparasitas em rebanhos leiteiros é uma prática frequente no Brasil.

Os benzimidazóis, devido ao baixo custo e à possibilidade de uso em fêmeas lactantes, têm sido os fármacos antiparasitários mais utilizados nas últimas décadas (DAYAN, 2003). No entanto, a despeito do período de carência preconizado pelos órgãos reguladores e fabricantes (MORENO et al., 2005), resíduos de benzimidazóis já foram detectados em leite bovino destinado ao consumo humano (BARKER; KAPPEL, 1997; BRANDON et al., 2002).

Dentre os benzimidazóis, o albendazole é um carbamato ativo que apresenta baixa toxicidade para os animais e amplo espectro de ação contra os parasitas e, por essa razão, o seu uso para o controle parasitário em animais de produção tem se tornado extremamente comum em todo o mundo (CAPECE et al., 2002; EMEA, 1997).

Por outro lado, a FAO/WHO (1989) alerta para o efeito tóxico do albendazole, incluindo alguns estudos sobre efeitos carcinogênicos, genotóxicos e teratogênicos (LANUSSE et al., 2009). Quando ingerido durante o primeiro terço da gestação, pode provocar embriotoxicidade, efeito possivelmente resultante da sua capacidade para se ligar à tubulina durante o desenvolvimento embrionário (CAPECE et al., 2002). Embora a Comunidade Europeia tenha estabelecido o limite máximo de resíduo no leite em 100 $\mu g\ L^{-1}$ (REGULAMENTO (CE) 1646/2004), as informações sobre a excreção do albendazole e dos seus metabolitos através do leite de cabra ainda são escassas (DAYAN, 2003).

Dessa forma, considerando que o leite oriundo de caprinos nativos é amplamente utilizado pelas famílias de baixa renda, especialmente aquelas da região Nordeste, este estudo objetivou desenvolver e validar um método para determinação do albendazole em

amostras de leite de cabra por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), bem como determinar a excreção de albendazole em leite de cabras nativas após tratamento antiparasitário.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Coleta de amostras de leite

Os animais utilizados pertenciam a um rebanho composto por 240 matrizes nativas (Sem Raça Definida - SRD), criadas extensivamente em pastagem nativa. A propriedade está localizada no município de Brumado-BA (14°00'00”S, 41°26'00”O), a 422 m de altitude, clima semiárido com temperatura média de 25ºC e precipitação pluviométrica média 653 mm, distribuída em cinco meses do ano (INMET,2006).

Para esse estudo, foram selecionadas aleatoriamente 12 cabras lactantes, pluríparas e tratadas com vermífugo a base de albendazole (Aldazol Oral®, Vallée, Brasil), na dose de 7,5 mg/kg de peso vivo, conforme sugerido pelo fabricante.

As amostras de leite foram coletadas antes e após a aplicação do medicamento (0, 24, 48, 72 e 96 horas), acondicionadas em sacos plásticos descartáveis devidamente identificados e então mantidas congeladas em freezer (-20ºC) até o momento das análises no Laboratório de Química Analítica da UESB, para determinação de resíduos de albendazole.

5.2.2 Preparo das soluções analíticas e da fase móvel

Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultra pura, obtida pelo sistema de purificação (Millipore, São Paulo, SP, Brasil). As soluções analíticas de referência foram preparadas por sucessivas diluições do padrão de albendazole (Albendazole®, Fluka, Sigma-Aldrich, EUA). Inicialmente, preparou-se 100,0 mL de solução estoque com concentração de 1000 mg L^{-1} do padrão da albendazole, a qual foi armazenada em frascos de polipropileno descontaminados (Company, Rochester, NY, USA). A partir da solução estoque, foram preparadas as soluções de trabalho em concentrações adequadas (10, 30, 60, 120, 240 e 480) para a construção das curvas analíticas, cujos valores são apresentados. O diluente utilizado foi uma solução composta por metanol grau CLAE (Álcool metilico UV-IR-CLAE isocrático, Panreac, Espanha) e clorofórmio (Clorofórmio UV/CLAE espectroscópico, Vetec, Brasil) na proporção 30:70 v/v, respectivamente, conforme sugerido por Waldia et al., (2008). As soluções de trabalho foram preparadas sempre no dia das análises e descartadas ao final da rotina.

A fase móvel foi preparada pela adição de acetonitrila grau CLAE (UV-IR-CLAE isocrático, Panreac, Espanha), água Milli-Q e metanol na proporção 60:10:30 (v/v/v), respectivamente (WALDIA et al., 2008).

5.2.3 Preparação das amostras de leite, extração, detecção e quantificação do analito

Após o descongelamento das amostras, uma alíquota de 2,0 mL de leite foi transferida para um tubo de ensaio, acrescida de 2,0 mL de acetonitrila e centrifugada a 1370 x *g*, por 5 minutos, para obtenção do extrato.

O procedimento de extração do albendazole das amostras de leite foi realizada em três etapas: i) ativação dos cartuchos de extração em fase sólida - EFS sílica-C18 19% de carbono (500 mg.3 mL^{-1}), ii) adsorção do albendazole ao sorvente, iii) eluição do albendazole, e iiii) lavagem do cartucho.

Para a ativação do cartucho, foram utilizados 3,0 mL de acetona e 2,0 mL de acetonitrila, com aplicação de vácuo, de modo a alcançar vazão de 3,0 mL min^{-1}. Posteriormente, para adsorção do albendazole ao sorvente, 2 mL do extrato foi adicionado à coluna, com aplicação de vácuo, como descrito anteriormente. Para eluição do albendazole, foram utilizados 3,0 mL de acetonitrila. A amostra obtida foi reconstituída com 2 mL de uma mistura de acetonitrila/água/metanol 60:10:30 (v/v/v) em um balão de 5,0 mL e então filtrada com filtro de seringa de 0,22 µm. Uma vez realizada a eluição, a coluna foi lavada a vácuo, duas vezes, utilizando na primeira lavagem 4,0 mL de acetonitrila, por três minutos, e na segunda, 6,0 mL de hexano, por dois minutos.

A detecção do albendazole foi realizada através de sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, composto de uma bomba de série 200, válvula de amostragem, *loop* de 20 µL e um detector série UV/VIS (CLAE, Perkin Elmer, USA).

Para separação cromatográfica do albendazole, foi utilizada uma coluna de 250 x 4,5 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula (RP-C18, Thermo, USA). Cada amostra injetada em triplicata (20,0 µL) foi submetida a uma eluição isocrática, com a composição da fase móvel acetonitrila/água/metanol 60:10:30 (v/v/v), fluxo de 1,8 $mL.min^{-1}$. A detecção do albendazole foi realizada à temperatura de 30ºC, utilizando comprimento de onda de 245 nm.

5.2.4 Validação do método

Os procedimentos de validação do método de análise foram realizados com base nos parâmetros de linearidade, exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade e reprodutibilidade parcial) limite de detecção e quantificação (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003).

5.2.5 Análise estatística

Os dados quantitativos obtidos da concentração de albendazole, nos diferentes dias de coleta, foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste Tukey (SAS, versão 8.0). As diferenças foram consideradas significativas com $P<0,05$. Para determinação das curvas analítica e de concentração do resíduo de albendazole, foram utilizadas regressões lineares com $P<0,01$ (SAS, versão 8.0).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Método analítico

Houve linearidade da curva analítica traçada por padronização do analito albendazole na concentração de 10 a 480 μg mL^{-1} com coeficiente de determinação de 0,9956 (Figura 1). Este valor está de acordo com os critérios de aceitabilidade de resultados do CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO, 1993), o qual determina o coeficiente da curva analítica (R^2) ≥0,995 da ANVISA (2003), que recomenda um coeficiente de determinação igual a 0,98, e do INMETRO (2003), um valor acima de 0,90.

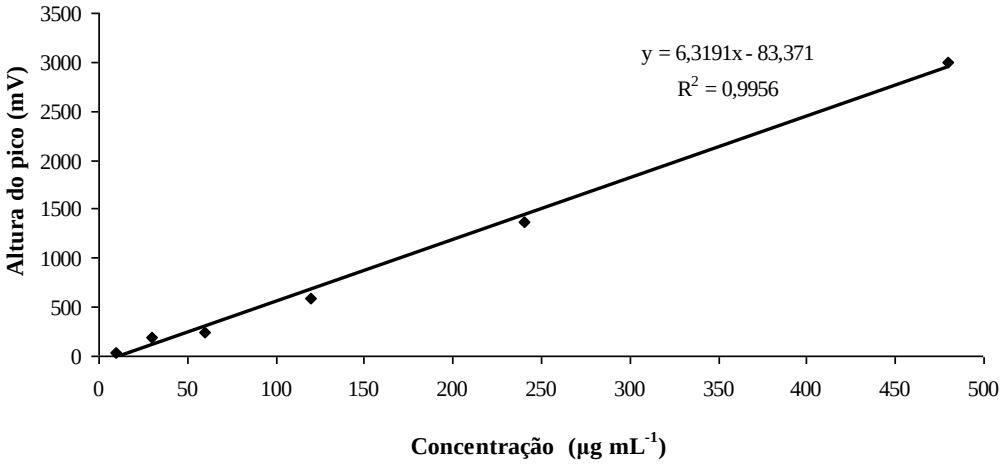


Figura 1 - Curva analítica obtida por CLAE/UV com leite caprino contendo diferentes concentrações de albendazole.

Na matriz leite bovino, De Ruyck et al. (2000), determinando resíduos de benzimidazóis por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, obtiveram linearidade com coeficiente de 0,9999 na faixa 20 a 5000 ng mL^{-1} para o albendazole. Moreno et al. (2005), realizando comparação dos perfis de resíduos de benzimidazóis por cromatografia líquida – CL, relataram que os coeficientes variaram entre 0,994 e 0,999. De maneira similar, Xia et al. (2010), utilizando cromatografia líquida de ultra alta eficiência, acoplada a espectrometria de massa (UCLAE/EM), obtiveram curvas de calibração lineares com coeficientes de determinação >0,991 para benzimidazóis. Assim, o coeficiente de determinação obtido com CLAE/UV, encontrado para o albendazole no presente estudo,

apresenta-se dentro dos padrões de aceitabilidade dos órgãos nacionais e internacionais e em conformidade com os trabalhos citados.

O tempo de retenção do albendazole na solução padrão e nas amostras foi de 2,16 e 2,17 minutos, respectivamente, mostrando concordância entre as curvas de intensidade de resposta e tempo de retenção (Figura 2). Whelan et al. (2010), trabalhando com cromatografia líquida de ultra alta eficiência, acoplada a espectrometria de massa (UCLAE/EM), encontraram tempo de retenção de albendazole de 5,86 minutos em amostras fortificadas de leite bovino.

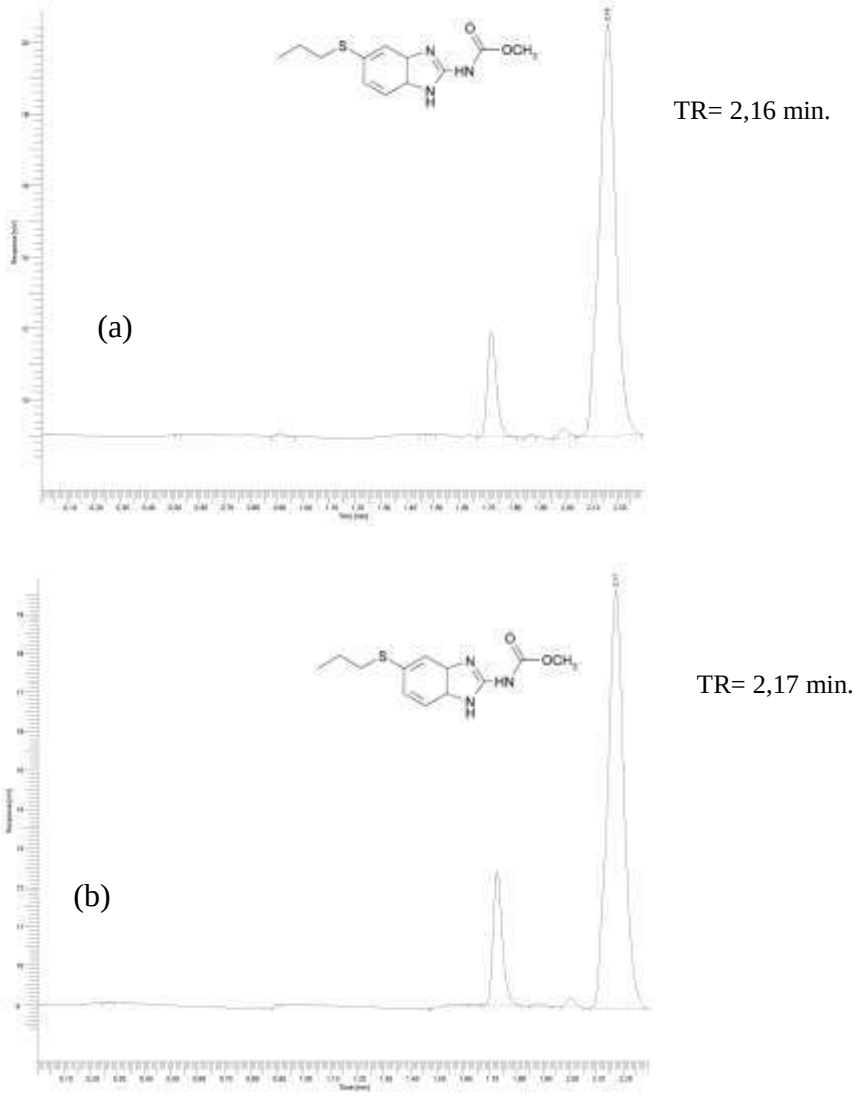


Figura 2 - Cromatogramas obtidos com a solução padrão de albendazole (a) e com amostras de leite de cabras contendo resíduos de albendazole (b) com os respectivos tempos de retenção (TR).

Considerando que o tempo de retenção é o tempo gasto desde o ato da injeção até a saída do ponto máximo do pico no sistema cromatográfico, englobando, portanto, todo o tempo que o componente fica no sistema, mudanças em variáveis experimentais, como temperatura interna da coluna, fase móvel utilizada, o método de injeção, podem influenciar no tempo de retenção obtido.

Em todas as amostras fortificadas, independente da concentração (10, 120 ou 480 μg mL^{-1}), foi identificado resíduo de albendazole, cuja taxa de recuperação média foi de 88,5% (Tabela 1).

Em leite bovino, a taxa de recuperação parece sofrer influência do método de análise. De Ruyck et al. (2000), utilizando CLAE, obtiveram taxas de 68,0% a 85,0%; Moreno et al. (2005), utilizando CL, encontraram taxas entre 77,0 e 97,0%; e Xia et al. (2010), utilizando CLAE/EM, descrevem taxas entre 80,5% e 101,3%. De acordo com a ANVISA (2003), a taxa de recuperação deve ser próxima de 100%, mas se a recuperação for precisa e exata, valores menores são admitidos.

Os valores médios de repetibilidade e de reprodutibilidade parcial para os diferentes níveis de concentração (10, 120 e 480 μg mL^{-1}) foram 16,9% e 16,2%, respectivamente (Tabela 1).

Os limites de detecção e de quantificação do albendazole no presente estudo foram 1,28 μg mL^{-1} e 3,89 μg mL^{-1}, respectivamente. Xia et al. (2010) obtiveram valores de reprodutibilidade parcial ≤14% com limite de detecção e limite de quantificação do método de 0,01 a 0,5 μg L^{-1} e de 0,1 a 1,0 μg L^{-1}, respectivamente, enquanto que De Ruyck et al. (2000) encontraram valores de limite de detecção e quantificação de 3,8 e 6,9 ng mL^{-1}, ambos trabalhando com leite bovino.

Embora seja recomendável que os valores de repetibilidade e reprodutibilidade parcial não devem exceder 15% (ANVISA, 2003), o valor máximo aceitável deve ser definido em função da metodologia empregada, concentração do analito na amostra, matriz e da finalidade do método.

Tabela 1 - Taxas de recuperação, repetibilidade e reprodutibilidade parcial do método analítico utilizado para detecção do analito albendazole em leite caprino[1]

Concentração (μg mL^{-1})	**Recuperação (%)**	**Repetibilidade (%)[2]**	**Reprodutibilidade parcial (%)[2]**
10	85,5	14,8	16,3
120	89,4	17,3	16,8
480	90,6	18,6	15,6

[1] Acrescido de solução padrão de albendazole; [2] Valores expressos em desvio padrão relativo.

Os valores de precisão (repetibilidade e de reprodutibilidade parcial), encontrados neste estudo, foram expressivos nas diferentes concentrações do analito, bem como a taxa de recuperação, os limites de detecção e de quantificação apresentaram-se dentro dos limites recomendados, demonstrando que o método analítico utilizado no presente estudo mostrou-se adequado para determinação de resíduo de albendazole em leite caprino.

5.3.2 Resíduo de albendazole no leite de cabras nativas

A excreção do albendazole no leite ocorreu de forma diferenciada em função do tempo após aplicação do fármaco. As taxas de decréscimo do resíduo nas amostras, nos intervalos de 24-48 horas; 48-72 horas; 72-96 horas, após a aplicação do fármaco, foram de 63,34%; 40,18% e 100,0%, respectivamente (Figura 3).

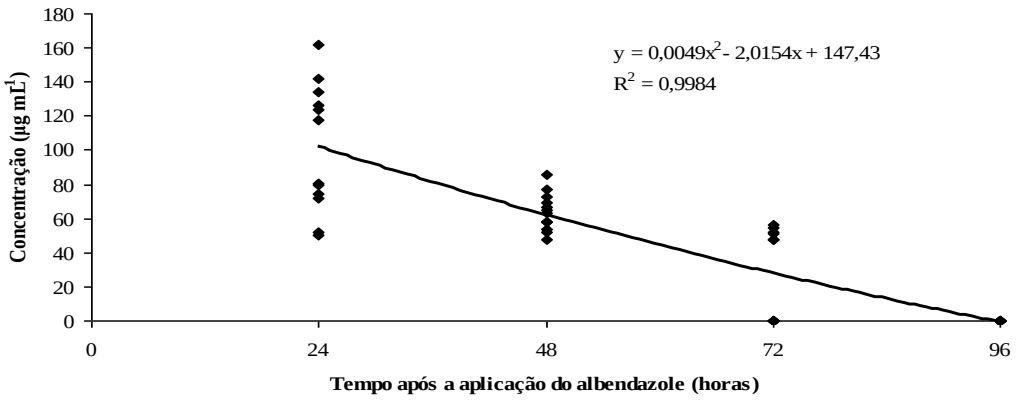


Figura 3 - Curva de concentração do resíduo de albendazole no leite de cabras nativas tratadas.

As concentrações médias de albendazole no leite decresceram de forma gradual no período avaliado, sendo que 72 horas após administração, 50% das amostras apresentaram concentrações $\geq$47,61 µg mL^{-1} e 50% não apresentaram valores acima do limite de detecção. Em nenhuma amostra foi detectado resíduo de albendazole 96 horas após sua administração (Tabela 2).

O tempo de excreção do albendazole no leite parece variar em pequenos e grandes ruminantes. Chu et al. (1993), avaliando a excreção de resíduos marcadores de albendazole em leite bovino, encontraram valores <100 µg L^{-1} 48 h após o tratamento. Em leite de cabra e ovelha, Cinquina et al. (1996) relataram que somente decorridas 72 horas após a aplicação do fármaco a concentração alcançou valor médio <100 µg L^{-1}. No presente

estudo, o tempo necessário para que os valores residuais se apresentassem <100 μg L^{-1} foi menor do que os descritos na literatura para o leite das espécies caprina e ovina, uma vez que a concentração média de albendazole foi de 64,10±11,0 μg mL^{-1} às 48 horas após a aplicação do fármaco, sugerindo que as cabras nativas apresentam metabolização do albendazole mais acelerada que as cabras especializadas.

Tabela 2 - Resíduos de albendazole encontrados no leite de cabras nativas nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas após aplicação do fármaco.

Animais/Tempo	Concentração de albendazole (μg mL^{-1})			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
1	79,24	52,06	47,61	< 1,28
2	74,26	64,62	54,09	< 1,28
3	134,36	53,89	51,04	< 1,28
4	161,95	66,93	< 1,28	< 1,28
5	126,23	72,37	< 1,28	< 1,28
6	123,85	85,57	47,87	< 1,28
7	80,30	77,3	< 1,28	< 1,28
8	142,29	69,5	< 1,28	< 1,28
9	117,47	58,29	52,03	< 1,28
10	52,12	58,06	< 1,28	< 1,28
11	71,77	62,89	56,46	< 1,28
12	50,39	47,73	< 1,28	< 1,28
Média	101,20± 37,4[A]	64,10± 11,0[B]	25,76± 27,00[C]	< 1,28

Valores seguidos de letra diferente diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).
1,28 - Valor do limite de detecção

De acordo com Moreno et al. (2005), a metabolização do fámaco parece sofrer influência da estrutura química da molécula e da via de administração. As concentrações máximas no leite bovino de oxfendazole, fenbendazole e albendazole foram obtidas 12, 24-36 h, e 12 h, respectivamente, após a administração. Por outro lado, a concentração de resíduos de oxfendazole e albendazole é mais elevada no leite bovino, quando administrados pela via oral do que pela via subcutânea. Este diferencial no padrão de excreção pode ser consequência direta da dose utilizada, uma vez que são utilizadas 5,0 e 3,0 mg kg^{-1} pela via oral e subcutânea, respectivamente.

As maiores concentrações de albendazole foram verificadas nas primeiras 24 horas (101,20±37,4), tendo sido detectado resíduo em todas as amostras avaliadas até 48 horas após administração do fármaco. A quantidade de resíduo excretado 24 horas após a administração do albendazole possibilitou a formação de dois grupos nitidamente distintos, 50% apresentaram concentração média de 68,01±13,37 μg mL^{-1} e 50% 134,36±16,04 μg mL^{-1}. No entanto, a despeito da expressiva diferença entre os animais quanto à quantidade excretada nas primeiras 24 horas (amplitude de 111,56 μg mL^{-1}), foi verificado que a

excreção do albendazole no período entre 48 e 72 horas ocorreu de maneira relativamente padronizada.

Do grupo com maior volume de excreção, 66,7% das cabras mantiveram esse perfil em relação às demais, no tempo de 48 horas, entretanto, 33,3% reduziram drasticamente a quantidade excretada, demonstrando a ocorrência de individualidade no perfil de excreção do albendazole (Tabela 2). Brandon et al. (2002), ao determinarem o perfil de excreção do fenbendazole em leite bovino, também observaram variação considerável entre os animais. A expressiva variação entre os indivíduos, no presente estudo, pode ser atribuída à diversidade genética das cabras nativas.

Apesar das concentrações de albendazole, encontradas neste estudo 72 horas após o tratamento, serem inferiores ao limite máximo aceitável recomendado pelos órgãos oficiais de saúde, e apesar de alguns fabricantes recomendarem a utilização do leite 48 horas após a aplicação do fármaco, sua utilização torna-se inadequada, tendo em vista que, em 50% das amostras avaliadas, ainda foram encontrados resíduos do fármaco em concentrações semelhantes às observadas em amostras, às 48 horas, podendo haver acúmulo de resíduos no organismo.

Considerando a capacidade do albendazole para ligar-se com a tubulina (proteína solúvel que constitui a estrutura básica dos microtúbulos) e inibir a sua polimerização aos microtúbulos, interferindo, assim, com a atividade mitótica e considerando que o fuso mitótico, agente mecânico no processo cariocinético, é composto de microtúbulos (TERUEL et al., 2011), a ingestão de leite com elevadas concentrações de albendazole poderia, além de ocasionar o efeito de resistência parasitária, pormover efeitos embriotóxicos. Portanto, do ponto de vista de segurança alimentar, o consumo do leite de cabras tratadas com albendazole deve ser indicado para consumo humano após as concentrações de resíduos encontrarem-se abaixo do limite de detecção, previamente determinados, os quais devem ser estabelecidos com base em novas pesquisas que determinem a relação entre a concentração e os efeitos embriotóxicos deste fármaco.

5.4 CONCLUSÕES

O método de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV/VIS é eficaz para detecção e quantificação de resíduos de albendazole no leite caprino, tendo em vista que o limite de detecção (1,28 μg mL^{-1}) e quantificação (3,89 μg mL^{-1}) são significativamente inferiores ao limite máximo de resíduo aceitável pelos órgãos oficiais de saúde.

O uso do albendazole no controle endoparasitário em cabras lactantes possibilita a presença de resíduos no leite pelo período de até 72 horas após tratamento, ainda que apenas em alguns animais e abaixo do limite máximo aceitável pelos órgãos oficiais de saúde. Portanto, do ponto de vista de segurança alimentar, o leite de cabras tratadas com albendazole deve tecnicamente ser liberado para consumo humano após 96 horas da sua administração.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Resolução 899,** de 29/05/2003, que trata da validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Brasília, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de origem animal – PAMVet**. Relatório 2004/2005: monitoramento de resíduo em leite exposto ao consumo. ANVISA/Ministério da Saúde: 2006, 46p. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/pamvet/. Acesso em: 10/03/2009.

BARKER, S. A.; KAPPEL, L. C. Drug residues in milk from cows administered fenbendazole as a paste, drench, or feed top-dressing. **Journal of Veterinary Pharmacolology and Therapeutics**, v. 20, p. 160-162, 1997.

BRANDON D. L.; BATES, A. H.; BINDER R. G.; MONTAGUE JR W. C.; WHITEHAND, L. C.; BARKER, S. A. Analysis of fenbendazole residues in bovine milk by ELISA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5791-6. 2002.

CAPECE, B. P. S.; PÉREZ, R.; ANDALUZ, A.; F. PÉREZ; GARCIA, F.; CASTELLS, G.; ARBOIX, M.; CRISTÒFOL, C. Placental transfer of albendazole sulphoxide enantiomers in sheep. **Veterinary Journal**, v. 163, p. 155-160, 2002.

CHU, P. S.; WANG, R.Y.; BRANDT, T. A.; WEERASINGHE, C. A. Determination of albendazole-2-aminosulfone in bovine milk using high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. **Journal of chromatography**, v. 620, n. 1, p.129-135, 1993.

CINQUINA, A. L.; LONGO, F.; RAPONI, A.; FAGIOLO, A.; CIVITAREALE, C.; BRAMBILLA, G.; COZZANI, R. In: N. HAAGSMA, A. RUITER (Eds.), **Proceedings of EuroResidue III Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food**, Veldhoven, The Netherlands, Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands, May 6-8 1996, p. 331.

DAYAN, A. D. Albendazole, Mebendazole and Praziquantel. Review of Non-Clinical Toxicity and Pharmacokinetics. **Acta Tropica**, v. 86, p. 141-159, 2003.

DE RUYCK, H.; VAN RENTERGHEM, R.; DE RIDDER, H.; DE BRABANDER, D. Determination of anthelmintic residues in milk by high performance liquid chromatography. **Food Control**, v. 11, p. 165-173, 2000.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMEA. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. **EMEA/MRL/247/97-FINAL, 1997**. Albendazole summary report 2.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. rev. 1. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003. 36 p.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET. **Relatório de dados diários por ano**. 4º Distrito de Meteorologia, 2006.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JEFCA). Codex Alimentarius Comission. **Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food**. 1993.

JOINT FAO/WHO COMITÉ MIXTO DE EXPERTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIUS. Evaluación de ciertos residuos farmacos de uso veterinario en los alimentos. **34º Informe del Comité Mixto FAO/WHO de Expertos en Aditivos Alimentarios**. 1989. 72 p.

LANUSSE, C. E.; ALVAREZ, L. I.; LIFSCHITZ, A. L. **Princípios farmacológicos da terapia anti-helmíntica**. CAVALCANTE, A.C.R., VIEIRA, L.S., CHAGAS, A.C.S. MOLENTO,M.B. (Eds)Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. 2009. p. 549-603.

MORENO, L.; IMPERIALE, F.; MOTTIER, L.; ALVAREZ, L.; LANUSSE, C. Comparison of milk residue profiles after oral and subcutaneous administration of benzimidazole anthelmintics to dairy cows. **Analytica Chimica Acta**, v. 536, p. 91-99, 2005.

PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 88-113, 2007.

REGULAMENTO (CE) N. 1646/2004 DA COMISSÃO de 20 de Setembro de 2004. **Jornal Oficial da União Européia**, 2004, L 296/5.

RIBEIRO, E. L. A.; RIBEIRO, H. J. S. S. **Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra.** Semina: Ciências Agrárias, v. 22, p. 229-235, 2001.

TERUEL, M.; D'ERCOLE, J.; CATALANO, R. Evaluation of potential embryo toxicity of albendazole sulphoxide in CF1 mice. **BIOCELL**, v. 35, n. 1, v. 29-33, 2011.

WALDIA, A.; GUPTA, S.; ISSARANI, R.; NAGORI, B. P. Validated liquid chromatographic method for simultaneous estimation of albendazole and ivermectin in tablet dosage form. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 15, p. 617-620, 2008.

WHELAN, M.; KINSELLA, B.; FUREY, A.; MOLONEY, M.; CANTWELL, H.; LEHOTAY, S. J.; DANAHER, M. Determination of anthelmintic drug residues in milk

using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. J**ournal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4612-4622, 2010.

XIA, X.; DONG,Y.; LUO, P.; WANG, X.; LI, X.; DINGA, S.; SHEN, J. Determination of benzimidazole residues in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 3174-3180, 2010.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os aspectos físico-químicos (acidez titulável, densidade, gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado) do leite de cabras nativas criadas em sistema extensivo na caatinga apresentam variações expressivas ao longo da lactação, com percentuais médios de proteína, gordura e lactose dentro dos limites estabelecidos pela IN-37;

O leite de cabras nativas apresenta predominância de ácidos graxos saturados, mantendo ao longo da lactação uma proporção média de 78:20:2 para ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, respectivamente;

Considerando as variações físico-químicas do leite de cabras nativas, as quais constituem o maior efetivo de matrizes do rebanho nacional, os valores de referência estabelecidos pela legislação brasileira para densidade, gordura e extrato seco desengordurado devem ser reavaliados;

O método de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV/VIS é eficaz para detecção e quantificação de resíduos de ivermectina e albendazole no leite caprino, podendo ser utilizado como instrumento de controle e certificação de qualidade deste produto, uma vez que o limite de detecção e quantificação para ambos os fármacos são significativamente inferiores ao limite máximo de resíduo aceitável pelos órgãos oficiais de saúde.

O leite de cabras tratadas com antiparasitários à base de albendazole ou ivemectina, via oral, apresenta resíduos em concentrações inferiores ao limite máximo aceitável, estabelecido pelos órgãos nacionais e internacionais de saúde (ANVISA, CE e WHO), sendo abaixo de 1,28 $\mu g\ mL^{-1}$ às 96 horas após o tratamento, no caso do albendazole, e de 0,92 $\mu g\ mL^{-1}$ aos 42 dias com o uso da ivermectina, podendo tecnicamente ser indicado ao consumo humano, decorrido o período descrito após o tratamento.