

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Marina Pinheiro Lima Rosa

**Avaliação de Resíduos de Ivermectina em Carne Bovina: Estudo
Comparativo entre *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus* e seus
Cruzamentos**

São Paulo

2023

MARINA PINHEIRO LIMA ROSA

Avaliação de resíduos de ivermectina em carne bovina: estudo comparativo entre *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus* e seus cruzamentos

Versão original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada.

Departamento: Patologia

Área de Concentração: Patologia Experimental e Comparada

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvana Lima Górnjak

Co-orientador: Prof. Dr. André Tadeu Gotardo

São Paulo

2023

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

Catálogo na Publicação

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

Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rosa, Marina P. L.
Avaliação de Resíduos de Ivermectina em Carne Bovina: Estudo
Comparativo entre *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus* e seus
Cruzamentos / Marina P. L. Rosa ; orientador Silvana Lima Górnica ;
coorientador André Tadeu Gotardo.-- Pirassununga, 2023.
83 f. : il.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Patologia
Experimental e Comparada - Departamento de Patologia) - Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São
Paulo, 2024.

1. Antiparasitários. 2. Avermectina. 3. Resíduo. 4. Ponto de
aplicação. 5. Bovinos. I. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura de catalogação
na publicação: Maria Aparecida Laet - CRB 5673-8.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de Resíduos de Ivermectina em Carne Bovina: Estudo Comparativo entre *Bos taurus*, *Bos indicus* e seus Cruzamentos", protocolada sob o CEUA nº 3897180221, sob a responsabilidade de **Silvana Lima Górnjak** e equipe; **Marina Pinheiro Lima Rosa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/04/2021.

We certify that the proposal "Evaluation of Ivermectin Residues in Beef: Comparative study between *Bos indicus*, *Bos taurus* and crossbreed cattle", utilizing 36 Bovines (36 males), protocol number CEUA 3897180221, under the responsibility of **Silvana Lima Górnjak** and team; **Marina Pinheiro Lima Rosa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/14/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 03/2021 a 12/2021

Área: **Patologia Experimental E Comparado**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Machos**

idade: **12 a 36 meses**

N: **36**

Linhagem: **Nelore/ Angus/ meio sangue**

Peso: **300 a 500 kg**

Local do experimento: **Confinamento JBS Guaçara e e frigorífico Friboi Lins**

São Paulo, 16 de março de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo



CERTIFICADO : RELATÓRIO PARCIAL v16/01/2023

Certificamos que o RELATÓRIO PARCIAL (versão de 16/01/2023) da proposta intitulada "Avaliação de Resíduos de Ivermectina em Carne Bovina: Estudo Comparativo entre Bos taurus, Bos indicus e seus Cruzamentos", CEUA nº 3897180221 (01/03/2023), sob a responsabilidade de **Silvana Lima Gómiak** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) em 08/03/2023.

Término previsto: 12/2021

ANIMAIS UTILIZADOS

		Quantidade Aprovada	Quantidade Utilizada
Bovinos	Machos	51	75

São Paulo, 09 de março de 2023

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo



FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ROSA, Marina Pinheiro Lima

Título: Avaliação de resíduos de ivermectina em carne bovina: estudo comparativo entre *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus* e seus cruzamentos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICO

A todos aqueles que possibilitaram a realização deste trabalho, envolvidos de forma direta ou indireta, fazendo jus ao termo “trabalho em equipe”, e reiterando a força inerente aos indivíduos compromissados com um propósito, em prol de um bem comum.

AGRADECIMENTOS

- ✓ À Prof^a. Silvana L. Górnaiak e ao Prof. André T. Gotardo pela orientação, empatia e paciência.
- ✓ Ao Paulo Cesar e a Leonila Ester, por toda a ajuda, carinho e atenção.
- ✓ Ao LANAGRO de Porto Alegre e toda sua equipe pela enorme colaboração com a realização de todas as análises deste trabalho.
- ✓ À Camila Brossi, por todo seu esforço junto à JBS para que este projeto se concretizasse.
- ✓ À JBS pelo acolhimento do projeto, disponibilização dos animais *Bos indicus* e meio-sangue e por toda a ajuda.
- ✓ Ao confinamento Boitel da JBS em Castilho - SP e todos os seus funcionários, pela receptividade e por toda a ajuda com os procedimentos lá desenvolvidos.
- ✓ Ao frigorífico da JBS em Lins – SP e todos os seus funcionários, pela receptividade e pelo enorme empenho para que tudo corresse conforme o planejado durante as coletas.
- ✓ Ao pecuarista Miguel Lanzi e família pela receptividade e disponibilização dos animais *Bos taurus*, bem como a todos os funcionários da Fazenda Santa Terezinha.
- ✓ À prefeitura da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA/USP pela disponibilização dos animais.
- ✓ A todos os funcionários do confinamento e do abatedouro escola da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA/USP por toda a ajuda.

RESUMO

ROSA, M. P. L. **Avaliação de resíduos de ivermectina em carne bovina: estudo comparativo entre *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus* e seus cruzamentos**. 2023, f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O Brasil possui um dos maiores rebanhos bovinos do mundo, é um dos principais produtores de carne e seus derivados, sendo o maior exportador destes produtos. Embora a situação seja aparentemente favorável, o mercado externo exige segurança em relação à qualidade dos produtos. Neste sentido, a permanente preocupação com a sanidade do rebanho brasileiro é essencial para a conquista de novos mercados, bem como para a manutenção dos já conquistados. O uso de medicamentos veterinários é essencial para a profilaxia e o tratamento de doenças em animais produtores de alimentos, o que garante uma alimentação de qualidade e em quantidade para o consumo humano. Porém, a presença de resíduos de medicamentos em alimentos é um tema que vem ganhando importância nas discussões sobre segurança alimentar nas últimas décadas. Para o tratamento e combate a endo- e ectoparasitoses, responsáveis por grandes prejuízos na produção animal, o grupo das avermectinas, lactonas macrocíclicas, representa um dos mais importantes grupos de vermífugos utilizados na bovinocultura de corte. Devido ao seu amplo espectro de ação, alta eficiência e margem de segurança, a ivermectina (IVM) é a mais conhecida e utilizada entre as avermectinas. Na primeira parte deste estudo buscou-se identificar possíveis diferenças na concentração de resíduos de IVM em diferentes matrizes, considerando-se três grupos de bovinos (europeus, indianos e o cruzamento indiano x europeu) e diferentes tempos de coleta (0, 21, 28, 35 e 40 dias; n=5 animais/grupo/tempo). Na segunda parte procurou-se desenvolver uma metodologia para delimitar com exatidão o sítio de aplicação da IVM objetivando a quantificação exata de resíduos neste local. Os resultados obtidos evidenciaram grandes variações nas concentrações de resíduos de ivermectina obtidos nas matrizes avaliadas das diferentes subespécies. Ainda, o estudo evidenciou que cinco animais por ponto de coleta por grupo de tratamento, compromete a realização de uma análise estatística fidedigna, bem como o cálculo da curva de decaimento comprometendo a

determinação do período de carência. A metodologia proposta para marcação do ponto de aplicação mostrou-se eficaz. Neste sentido, a grande variabilidade na concentração de resíduo neste local evidencia a necessidade de mais estudos para definição de um protocolo de coleta de amostras neste ponto e, ainda, a importância em se considerar o tempo de depleção de resíduos no sítio de aplicação para a determinação do período de carência dos medicamentos.

Palavras-chave: Antiparasitário. Avermectina. Resíduo. Ponto de aplicação. Bovinos.

ABSTRACT

ROSA, M. P. L. **Assessment of ivermectin residues in beef: comparative study between *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus* and their crosses.** 2023, f. Dissertação (Master degree) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Brazil has one of the largest cattle population in the world, is one of the main producers of meat and its derivatives, and is the largest exporter of these products. Although the situation is apparently favorable, the foreign market requires security in relation to the quality of the products. In this sense, permanent concern about the health of the Brazilian herd is essential for conquering new markets, as well as maintaining those already conquered. The use of veterinary medicines is essential for the prophylaxis and treatment of diseases in food-producing animals, which guarantees quality and quantity of food for human consumption. However, the presence of drug residues in food is a topic that has gained in recent decades importance in discussions on food safety. For the treatment and combat of endo- and ectoparasitoses, responsible for major losses in animal production, the group of avermectins, macrocyclic lactones, represents one of the most important groups of antiparasitics used in beef cattle farming. Due to its broad spectrum of action, high efficiency and safety margin, ivermectin (IVM) is the best known and most used among the avermectins. In the first part of this study, the objective was to identify possible differences in the concentration of IVM residues in different matrices, considering three groups of cattle (European, Indian and the Indian x European cross) and different collection times (0, 21, 28, 35 and 40 days; n=5 animals/group/time). In the second part, the aim was to develop a methodology to accurately delimit the IVM application site with the goal of accurately quantifying residue in this location. The results obtained showed large variations in the concentrations of ivermectin residues obtained in the evaluated matrices of the different subspecies. Furthermore, the study showed that five animals per collection point per treatment group compromises the performance of a reliable statistical analysis, as well as the calculation of the decay curve, compromising the determination of the withdrawal period. The proposed methodology for marking the application point proved to be effective.

In this sense, the great variability in the residue concentration at this location call attention on the need for further studies to define a sample collection protocol at this point and, also, the importance of considering the residue depletion time at the application site for the determination of the withdrawal period for medicines.

Keywords: Antiparasitic. Avermectin. Residue. Injection site. Cattle.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1.	A PRODUÇÃO DE CARNE BOVINA NO BRASIL	14
1.2.	AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM TECIDOS DE ORIGEM ANIMAL	19
1.3.	LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO E PERÍODOS DE CARÊNCIA	22
1.4.	AVERMECTINAS	24
1.4.1.	Ivermectina	26
2.	OBJETIVOS	30
2.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3.	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1.	EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DOS RESÍDUOS DE IVM NOS DIFERENTES TECIDOS DAS DIFERENTES SUBESPÉCIES: <i>BOS TAURUS TAURUS</i> , <i>BOS TAURUS INDICUS</i> E SEUS CRUZAMENTOS	31
3.1.1.	Animais e Informações Sobre o Manejo	31
3.1.2.	Medicamento	34
3.1.3.	Procedimentos	34
3.1.3.1.	Avaliação coproparasitológica	34
3.1.3.2.	Avaliação clínica e pesagem	34
3.1.3.3.	Coleta de Sangue	35
3.1.3.4.	Dosagem de enzimas, componentes sanguíneos e hemograma	35
3.1.3.5.	Determinação da concentração plasmática de IVM	35
3.1.3.6.	Abate, desossa, coleta e preparo de amostras para determinação da concentração tecidual de IVM	36
3.1.3.7.	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)	39
3.1.3.7.1.	Padrões e reagentes	39
3.1.3.7.2.	Validação da metodologia	40
3.1.3.7.2.1.	Seletividade	40
3.1.3.7.2.2.	Linearidade e Limite de Quantificação	41
3.1.3.7.2.3.	Precisão e Exatidão	41
3.1.3.8.	Extração da 22,23 Dihidroivermectina-B _{1a} plasmática	42

3.1.3.9.	Extração da 22,23 Dihidroavermectina-B _{1a} nos diferentes tecidos	42
3.1.3.9.1.	Dados Instrumentais para quantificação da 22,23Dihidroavermectina-B _{1a}	43
3.1.4.	Delineamento experimental	44
3.2.	EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS RESÍDUOS DE IVM NO LOCAL DE APLICAÇÃO. ESTUDO EM BOVINOS DA SUBESPÉCIE NELORE	46
3.2.1.	Animais e Informações de Manejo	46
3.2.2.	Medicamento e corantes	46
3.2.3.	Procedimentos	47
3.2.3.1.	Preparo do medicamento e marcação do ponto de aplicação	47
3.2.3.2.	Abate, desossa, coleta e preparo de amostras	49
3.2.3.3.	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)	51
3.2.4.	Delineamento experimental	51
3.3.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
4.	RESULTADOS	53
4.1.	EXPERIMENTO 1	53
4.1.1.	Avaliação clínica, coproparasitológica, bioquímica e hematológica	53
4.1.2.	Quantificação da 22,23 Dihidroavermectina-B_{1a} plasmática	53
4.1.3.	Quantificação da 22,23 Dihidroavermectina-B_{1a} nos diferentes tecidos	54
4.2.	EXPERIMENTO 2.....	58
4.2.1.	Avaliação clínica, coproparasitológica, bioquímica e Hematológica	58
4.2.2.	Delimitação do sítio de aplicação	58
4.2.3.	Quantificação da 22,23 Dihidroavermectina-B_{1a} nos sítios de aplicação e contralateral	60
5.	DISCUSSÃO	61
6.	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73

1. INTRODUÇÃO

A introdução será composta por duas grandes partes, na primeira, procura-se contextualizar a produção de carne bovina no Brasil, apresentando as características desta produção animal dentro do agronegócio e, na segunda parte, será discorrido sobre a avaliação de resíduos de medicamentos em tecidos, particularmente aqueles provenientes do gado de corte.

1.1. A PRODUÇÃO DE CARNE BOVINA NO BRASIL

O sistema agroindustrial da carne bovina brasileira tem posição de destaque na economia nacional, a participação do agronegócio no produto interno bruto (PIB) total reflete tal posição. Em 2022, esta participação chegou a 24,8% (ABIEC, 2022). O Brasil possui clima, extensão territorial e disponibilidade de fatores de produção - nutrição, genética, manejo - que, unidos ao investimento tecnológico das últimas décadas, responsável tanto pelo aumento da produtividade, quanto da qualidade da carne, fazem do Brasil um dos mais importantes produtores e exportadores de carne bovina do mundo (ABIEC, 2022).

Embora a situação seja aparentemente favorável, o mercado externo exige segurança em relação à qualidade dos produtos. A presença de resíduos de medicamentos em alimentos é um tema que vem ganhando importância nas discussões sobre segurança alimentar nas últimas décadas (PALERMO-NETO et al., 2023). De forma geral, os consumidores expressam preferência por alimentos sem aditivos ou resíduos químicos, mas que sejam econômicos e seguros, sendo a segurança fator inegociável do produto (CANTÓN et al., 2022). Neste sentido, a permanente preocupação com a sanidade do rebanho brasileiro é essencial para a conquista de novos mercados, bem como para a manutenção dos já conquistados.

O uso de medicamentos veterinários é essencial para a profilaxia e o tratamento de doenças em animais produtores de alimentos, o que garante uma alimentação de qualidade e em quantidade para o consumo humano (CANTÓN

et al., 2021). Em sistemas de produção extensiva, o que corresponde a 82,8% da produção brasileira, dá-se maior ênfase à profilaxia médica no manejo sanitário (ABIEC, 2022; SOUZA, 2009). Em 2022 os investimentos no âmbito da sanidade animal movimentaram R\$ 3.068,3 milhões (ABIEC, 2022). De acordo com Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN, 2022), os ruminantes são responsáveis por 51% do faturamento da indústria veterinária e, se avaliarmos a representatividade por classe terapêutica, 26% do faturamento é oriundo dos antiparasitários, classe que corresponde a 35% de todos os medicamentos registrados para uso em bovinos (MAPA, 2023).

Para o tratamento e combate a endo- e ectoparasitoses, responsáveis por grandes prejuízos na produção animal, o grupo das avermectinas, lactonas macrocíclicas (LM), derivadas de processos de fermentação do fungo *Streptomyces avermitilis*, representa um dos mais importantes grupos de vermífugos utilizados na bovinocultura de corte. Devido ao seu amplo espectro de ação, alta eficiência e margem de segurança, a ivermectina (IVM) é a mais conhecida e utilizada entre as avermectinas (VERCRUYSSSE et al., 2002; ROMERO-GONZÁLEZ et al., 2014). Em diferentes apresentações comerciais, variando tanto forma farmacêutica e via de administração, como tipos de formulação, o Brasil possui cerca de 145 produtos registrados no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) com o princípio ativo IVM, dos quais 96 deles são para uso em bovinos (MAPA, 2023).

No Brasil, para obtenção do registro de um medicamento junto ao MAPA é necessária a apresentação de relatórios técnicos, comprovando a segurança, qualidade e eficácia deste, bem como os níveis de resíduos encontrados em diferentes matrizes (LOUSANA et al., 2020; CORDEIRO et al., 2023). O limite máximo de resíduos (LMR) de medicamentos veterinários são fixados por órgãos reguladores após análise de dados oriundos de estudos de depleção residual, e representam a concentração máxima de resíduos legalmente tolerada em um produto alimentar obtido de um animal que recebeu um medicamento veterinário (CODEX ALIMENTARIUS, 2021; PALERMO-NETO et al., 2020).

No caso da carne, os tecidos alvo analisados nos estudos de depleção residual são geralmente fígado, gordura, rim e músculo esquelético (WHO, 2009a; FDA, 2018; CANTÓN, 2022). Os tecidos com maior concentração de

resíduos são geralmente fígado, gordura e rim. No músculo, com exceção do sítio de aplicação onde os resíduos podem estar elevados, os níveis apresentam-se mais baixos se comparados aos três outros tecidos citados (CANTÓN et al., 2022). De fato, segundo um estudo realizado por Brossi (2018), os maiores níveis de IVM são encontrados no sítio de aplicação, seguido pelo fígado e gordura.

No que se refere ao sítio de aplicação, um estudo de lezzi et al. (2017) ressalta que, embora o período de carência estabelecido pelo fabricante tenha garantido níveis seguros de resíduos de IVM nos tecidos avaliados, o sítio de aplicação exige cautela, já que a detecção de concentrações residuais de fármacos neste local é muito variável e pode ser influenciado por fatores como a incompleta absorção do volume total administrado, por lesões geradas pelos diferentes veículos no local da injeção, pela precipitação do fármaco no local, ou ainda, pela administração do fármaco pela via IM e não SC, como indicado pelo fabricante (LEZZI et al., 2017).

Por outro lado, estudos de Chiu et al. (1986, 1988, 1990) indicam poder haver variação no padrão de depleção de resíduos de fármacos nos tecidos animais a depender de sua localização anatômica ou função fisiológica. Assim, por se tratar de um fármaco lipofílico, a IVM liga-se às lipoproteínas plasmáticas, principalmente lipoproteínas de alta densidade (HDLs), envolvidas no transporte reverso do colesterol, processo que transfere o colesterol da periferia dos tecidos para o fígado, onde é eliminado na bile. Esta associação com as HDLs e o transporte para o fígado para excreção via bile poderia explicar os níveis elevados de IVM no fígado (HOUSHAYMI et al., 2018; LESPINE, 2013).

Ainda, os níveis mais elevados de IVM na gordura quando comparado com outros tecidos, como o músculo, evidencia o papel da lipofilicidade na cinética da IVM e a influência da quantidade de lipídeos presente em cada tecido, ou seja, a propriedade lipofílica determina a capacidade do fármaco de ser armazenado nos tecidos adiposos e na partição dentro das membranas lipídicas, e explica a maior concentração de resíduos em tecidos com maiores proporções de lipídeos (LESPINE, 2013).

Análises de depleção residual são empregadas para o cálculo do período de carência de um medicamento (PALERMO-NETO et al., 2020; REEVES, 2007). Os testes são muitas vezes realizados no país detentor da patente da molécula, e novos testes não são obrigatórios para o registro do produto junto aos órgãos regulamentadores de outros países desde que tenham sido utilizados os mesmos LMRs para o estabelecimento do período de carência para ambos os países (MAPA, 1996). Neste sentido, é importante considerar que estudos de depleção residual de IVM, realizados pelo patrocinador, para derivação de LMRs determinados pelo JECFA, foram realizados fora do Brasil, com animais de origem europeia e não zebuína ou meio sangue; no entanto, deve-se considerar que esses animais de origem zebuína representam mais de 80% do gado bovino no país (ACNB, 2023).

Diversos fatores podem afetar a farmacocinética de um fármaco e os níveis de resíduos nos tecidos animais. De forma geral tais fatores podem ser divididos em dois grupos, os relacionados aos fármacos (formulação, local e via de administração, dose, uso de combinações e tempo após a administração) e os relacionados aos animais (raça, idade do animal, sexo e condição corporal, grau de parasitismo) (CANTÓN et al., 2022; CANGA et al., 2009; MCKELLAR, GOKBULUT, 2012; LIFSCHITZ et al., 1999; LANUSSE et al., 1997; MORENO et al., 2009; VERCRUYSSSE et al., 2002, 2008). De acordo com estudo realizado por GOTARDO et al. (2020), no qual foram avaliados os perfis farmacocinéticos da IVM em animais *Bos indicus*, *Bos Taurus* e meio sangue (*Bos indicus* x *Bos Taurus*) mantidos sobre as mesmas condições, as concentrações plasmáticas de IVM, a área sob a curva (ASC), o pico de concentração plasmática (C_{max}) e a meia vida de eliminação (t_{1/2}) foram consideravelmente afetadas pelo fator raça, apresentando valores significativamente maiores em animais *Bos indicus* quando comparados com os *Bos Taurus*. Os bovinos oriundos de cruzamentos mostraram perfis intermediários entre as raças de origem europeia e indiana. Além desses fatores, Martinez (2011) relata diversas outras variáveis que podem influenciar a biodisponibilidade do fármaco após a administração parenteral.

Com um rebanho de 202,78 milhões de cabeças e 42,31 milhões de cabeças abatidas em 2022, o Brasil foi capaz de abastecer o mercado interno e exportar 27,96% do total produzido ao mercado de mais de 124 países (ABIEC, 2023).

A realização de estudos que tentassem suprir a dificuldade de extrapolação de estudos farmacocinéticos e de depleção de resíduos conduzidos com bovinos europeus para indianos tornou-se fundamental na tentativa de evitar que, mesmo após o cumprimento do período de carência estipulado pelo fabricante, os LMRs em tecidos de animais oriundos do mercado brasileiro pudessem extrapolar aqueles estabelecidos pelos órgãos reguladores e permitidos pelos principais mercados, já que 80% do rebanho brasileiro é constituído por animais de origem *Bos indicus* e nem todos os tipos de tecido serem testados nos ensaios clínicos para a aprovação de um fármaco (WHO, 2009a; FDA, 2018; CANTÓN, 2022; BROSSI, 2018), além de nem todos os tecidos possuírem a mesma dinâmica de depleção da IVM (CHIU et al., 1990).

Como forma de proteção à saúde do consumidor, um dos princípios mais importantes prescritos pela legislação internacional é o de que alimentos oriundos de animais tratados com medicamentos veterinários não devem conter resíduos do medicamento ou de metabolitos que possam representar risco à saúde do consumidor (CANTÓN et al., 2021). Apesar dos órgãos fiscalizadores possuírem papel fundamental neste âmbito, em especial o MAPA, o comprometimento com a sanidade animal, qualidade e segurança dos alimentos não deve ser somente das instâncias do governo, mas de toda a cadeia produtiva (BNDES, 2001). Neste sentido, a análise de risco prévia e concomitante à utilização dos produtos veterinários de acordo com as Boas Práticas Veterinárias, ou seja, seguindo as instruções no rótulo da embalagem, administrando a dose correta pela via indicada nas espécies animais para as quais o medicamento é rotulado e, após o tratamento farmacológico, respeitando o período de carência antes que os tecidos dos animais tratados sejam consumidos por humanos, possibilita a identificação de riscos para a saúde humana ao mesmo tempo que garante a segurança alimentar nacional e internacional (CANTÓN et al., 2022).

1.2. AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM TECIDOS DE ORIGEM ANIMAL

A produção segura de alimentos em concentrações de resíduos químicos que não prejudiquem a saúde humana constitui uma importante preocupação e exige soluções urgentes devido às suas implicações na saúde pública e no comércio internacional de alimentos (CANTÓN et al., 2022). Devido à impossibilidade de se excluir completamente resíduos de medicamentos veterinários dos tecidos comestíveis, é necessário reduzi-los ao mínimo (LARA, 2008). A Comissão do *Codex Alimentarius* (CAC) afirma que para garantir a segurança alimentar, as regulamentações de um país devem ser baseadas em uma “análise de risco”, processo estruturado e sistemático, pelo qual os perigos que potencialmente afetam a saúde pública são examinados e as opções para mitigar o risco são estabelecidas (CANTÓN et al., 2022). Na Europa, após uma série de incidentes relacionados à segurança alimentar que desencadearam preocupação e ansiedade do consumidor em relação aos alimentos (VERBEKE et al., 2007), as autoridades reconheceram a falta de um sistema integrado na abordagem da cadeia alimentar. Esse fato resultou na introdução de novos princípios, como análise de risco, rastreabilidade, bem como na integração da cadeia alimentar da fazenda à mesa. Como resposta a essas necessidades foi estabelecida a EFSA, acrônimo em inglês para designar Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (CANTÓN et al., 2022).

A análise de risco é uma ferramenta que possibilita órgãos reguladores de segurança alimentar desenvolver programas de controle de segurança de alimentos mais eficientes com base em princípios científicos (LEÓN; SIGNORINI, 2020). A análise de risco é um processo que consiste na “avaliação de risco, no gerenciamento de risco e na comunicação de risco” (FAO/WHO, 2008). A avaliação de risco tem como objetivo estimar a probabilidade e a gravidade da exposição a um certo perigo, considerando as incertezas inerentes ao processo (LEÓN; SIGNORINI, 2020), através do fornecimento de uma base científica fundamental para as decisões de gerenciamento de risco que envolvem medidas que possam ser necessárias para garantir a saúde dos

consumidores. Ela contempla todos os dados científicos relevantes disponíveis e identifica incertezas (WHO, 2009b).

Na etapa da gestão de riscos os resultados gerados durante a avaliação de riscos são analisados e alternativas para seu manejo são estudadas, fatores que não se apoiam na ciência também são considerados para a seleção das medidas apropriadas de prevenção e controle (LEÓN, SIGNORINI, 2020). Como gestores de risco, a CAC e seus respectivos comitês são responsáveis pelas decisões que levam à determinação dos limites máximos de resíduos dos medicamentos veterinários em alimentos e à adoção de outras medidas relacionadas (WHO, 2009c). A comunicação de risco é a troca de informações e opiniões ao longo do processo de análise de risco sobre fatores e percepções relacionados ao risco, entre avaliadores de risco, gestores de risco, consumidores, comunidade acadêmica e outras partes interessadas, incluindo a descrição dos resultados da avaliação de risco e a base da gestão de risco (WHO, 2009c).

A avaliação de riscos é a responsável pela parte científica deste processo de análise e, é realizado a nível internacional pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) em conjunto com órgãos especializados da Organização Mundial da Saúde (OMS), que possuem ampla experiência na condução de avaliações de segurança química alimentar (WHO, 2009c). Desta forma, o Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/OMS (JECFA) trabalha em avaliações de contaminantes, como substâncias tóxicas naturais, resíduos de medicamentos veterinários e aditivos alimentares, realizando avaliações de risco que servem de base para padrões e regulamentos empregados para garantir a segurança alimentar nacional e internacional (BOOBIS et al., 2017). As avaliações realizadas pelo JECFA e JMPR, Comitê responsável por resíduos de praguicidas, servem como base científica para padrões alimentares (WHO, 2009d).

A avaliação de risco consiste em:

(1) Identificação dos perigos: aqui é estabelecido o tipo e a natureza dos efeitos adversos, cuja capacidade inerente de um agente pode causar em um organismo, sistema ou subpopulação (WHO, 2009c). O objetivo é avaliar as evidências de efeitos adversos à saúde, com base na avaliação de todos os

dados de toxicidade disponíveis (FAO/OMS, 2008). Os estudos toxicológicos podem ser divididos em estudos *in vitro*, utilizando organismos cultivados ou preparações de tecidos, e estudos *in vivo* em animais de laboratório ou raramente em humanos (WHO, 2009e). A partir destes estudos, a natureza de qualquer toxicidade ou efeitos adversos à saúde ocorrem e os órgãos ou tecidos-alvo afetados são identificados (WHO, 2009c).

(2) Caracterização do perigo: é a descrição qualitativa e, se possível, quantitativa das propriedades inerentes de um agente com potencial para causar efeitos adversos. Esta etapa inclui uma avaliação da dose-resposta, onde a relação entre a dose administrada ou exposição a um produto químico e a incidência de um efeito adverso à saúde é descrita. Nos casos em que se define que o efeito tóxico possui um limite, a caracterização do perigo leva ao estabelecimento de valores de orientação como medidas de saúde, como por exemplo o cálculo da ingestão diária aceitável (IDA), o NOAEL, o acrônimo em inglês para nível para efeito não observado, ou o ARfD, acrônimo em inglês para dose de referência aguda (WHO, 2009c).

(3) Avaliação da exposição: é a avaliação qualitativa e/ou quantitativa da provável ingestão de agentes químicos através dos alimentos e/ ou a exposição através de outras fontes, se relevante (FAO/OMS, 2008). Tal exposição pode ser avaliada antes de um produto químico ser aprovado para uso em alimentos (pré-regulamentação) ou após este ter sido aprovado e (pós-regulamentação). No processo de pré-regulação, os dados de concentração dos estudos de depleção de resíduos devem estar disponíveis junto aos patrocinadores ou fabricantes. Nessas avaliações, os limites máximos de resíduo (LMR) propostos podem ser usados como dados de concentração, com uma correção para o resíduo marcador ao resíduo total para cálculo de uma Ingestão Diária Máxima Teórica, ou TMDI (REUSS, 2014). No processo pós-regulamentação, monitoramento e programas de vigilância são utilizados para avaliações de exposição crônica, no qual estudos de depleção residual ao longo da cadeia produtiva – entre fazenda e produto final – devem ser considerados (WHO, 2020).

(4) Caracterização do risco: é a estimativa qualitativa e/ou quantitativa da probabilidade de ocorrência e gravidade dos efeitos adversos causados à saúde por um agente em um organismo, sistema ou (sub)população, sob condições de

exposição definidas (FAO/OMS, 2008). Ele integra informações da identificação de perigos, caracterização e avaliação da exposição para fornecer aconselhamento e tomada de decisão (WOODWARD, 2008). Na caracterização do risco de substâncias que apresentam efeitos limiares, os valores de referência toxicológicos são comparados com estimativas de exposição alimentar. Se as exposições estão abaixo do valor relevante, outras informações sobre a caracterização do risco não precisam ser fornecidas (WHO, 2009f).

1.3. LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO E PERÍODOS DE CARÊNCIA

O LMR de medicamentos veterinários é a concentração máxima de resíduos legalmente tolerado num produto alimentar obtido de um animal que recebeu um medicamento veterinário (CODEX ALIMENTARIUS, 2021). Para se estabelecer o LMR de uma substância química, nesse caso um medicamento veterinário, é necessário realizar o cálculo da IDA da substância para os consumidores, levando em conta o consumo médio alimentar de cada um dos gêneros alimentícios, definidos como "cesta básica", o comportamento farmacocinético da substância no animal, bem como um fator de segurança extra (PALERMONETO et al., 2020; CANTÓN et al., 2022).

Para garantir que os alimentos de origem animal não apresentem risco ao consumidor não promovendo danos à sua saúde, os resíduos de medicamentos nesses alimentos devem estar abaixo dos LMRs estipulados. Para tal, intervalos de segurança conhecidos como períodos de carência são estabelecidos (BROSSI, 2018). O período de carência se refere ao período necessário após a administração de um produto veterinário a um animal antes que o animal ou seus produtos (como, por exemplo, carne, leite ou ovos) possam ser considerados seguros para consumo humano. Durante esse período, o produto veterinário deve ser totalmente eliminado do organismo do animal ou reduzido a níveis seguros, a fim de evitar resíduos indesejados nos alimentos de origem animal (FAO/OMS, 2008).

Os procedimentos utilizados para a determinação de resíduos de medicamentos em alimentos de origem animal diferem entre países, da mesma

forma também os componentes da cesta básica. Distintos métodos são aplicados para determinar LMRs e períodos de carência para resíduos de medicamentos em tecidos comestíveis; no entanto, considerando que os valores de LMRs são cruciais para importação e exportação de produtos de origem animal, esta falta de harmonização dos LMRs e do cálculo dos períodos de carência pode gerar obstáculos ao comércio de alimentos entre países (CANTÓN et al., 2021).

Os períodos de carência são estabelecidos para cada produto ao término dos estudos de depleção e, geralmente, são apresentados às agências reguladoras de cada país associados a um pedido de comercialização do medicamento. Assim, a partir de guias internacionais as agências determinam os requisitos necessários para tais estudos. Nestes guias, são apresentados pontos cruciais para a realização dos estudos, como o tamanho amostral, a espécie animal, bem como suas categorias, que devem ser utilizados, as doses a serem administradas, os momentos de coleta das matrizes, o método de amostragem e os procedimentos e cálculos estatísticos para definição dos períodos de carência, bem como para a validação dos métodos analíticos utilizados para a extração e quantificação de resíduos dos fármacos nos estudos de depleção (PALERMO-NETO, 2023).

O resíduo marcador é o medicamento original ou qualquer um de seus metabólitos ou uma combinação de qualquer um deles com uma relação conhecida com a concentração do resíduo total em cada um dos vários tecidos comestíveis dentro do período de carência (WHO, 2009a; PALERMO-NETO, 2023). De forma geral, a depender do fármaco em questão, após a administração de um medicamento em um animal, os tecidos com maior concentração de resíduos são, de maneira geral, fígado, rim ou gordura, sendo os resíduos no músculo mais baixos. Desta forma, quando utilizados em animais, os riscos para a saúde pública após o consumo de qualquer tecido comestível devem ser mínimos (CANTÓN et al., 2021).

O período de carência deve basear-se em estudos de resíduos realizados nas condições de utilização indicadas no rótulo (espécie, raça do animal, dosagem, via de administração) para garantir que produtos de origem animal utilizados como alimentação humana não apresentem resíduos acima dos LMRs

estipulados (CANTÓN et al., 2021). Durante este período o metabolismo animal reduz as concentrações do fármaco nos tecidos para níveis que não são preocupantes para a saúde pública. A falha para aderir aos períodos recomendados é relatado como a principal causa de níveis não conformes de medicamentos veterinários em alimentos (KUKANICH et al., 2005).

Por outro lado, o sítio de aplicação é um tema ainda controverso, pois pode apresentar níveis de resíduos acima dos LMRs estabelecidos para a matriz músculo, o que poderia acarretar algum grau de toxicidade aguda (IEZZI et al., 2017). De fato, sabe-se que a detecção de concentrações de resíduos do fármaco no sítio de aplicação pode ocorrer pela absorção incompleta do volume total administrado, como resultado de um processo inflamatório no tecido causado pelos diferentes tipos de veículos utilizados nas formulações ou pela própria precipitação do fármaco, o que pode contribuir para que uma parte da dose administrada persista neste local (GEORGE; HEINRICH; DEXTER, 1995; MANN et al., 2011; VAN DONKERSGOED et al., 2000; REEVES, 2007); portanto, conforme já comentado, mesmo sendo músculo, que normalmente possui níveis mais baixos do que fígado, rins e gordura, especificamente no local de aplicação pode haver níveis bastante elevados do medicamento.

1.4. AVERMECTINAS

As avermectinas são derivados macrocíclicos da lactona que começaram a ser utilizados a partir da década de 1980 (BATIHA., 2020) após a descoberta de que o produto da fermentação do actinomiceto, *Streptomyces avermitilis* apresentava alta atividade contra a proliferação de ecto e endoparasitas (BURG et al., 1979). Os principais antiparasitários pertencentes a este grupo são a IVM, a abamectina, a doramectina, a selamectina e a eprinomectina (LOPES et al., 2014; DONG;ZHANG, 2022).

A fermentação do fungo *S. avermitilis* gera naturalmente uma série de substâncias que, dependendo da presença de grupos metoxi ou hidróxido no carbono 5 (C-5), são classificadas como “A” e “B”, respectivamente. Estes compostos também são classificados em A1 e B1 se possuem uma ligação dupla

entre os C-22 e C-23 e, em A2 e B2 se possuem uma ligação simples e uma substituinte hidróxido no C-23. São classificados ainda em “a” e “b” dependendo do grupo que apresentam no C-25, butil (“a”) ou isopropil (“b”) (SANTARÉM et al., 2023). A_{1a}, A_{2a}, B_{1a} e B_{2a} são obtidos em maiores quantidades, sendo A_{2a}, B_{1a} e B_{2a} os principais produtos da fermentação (BATIHA., 2020; BROSSI, 2018).

A avermectina B1, conhecida como abamectina, é uma importante avermectina produzida naturalmente, a partir da qual outras formas de avermectinas são originadas (DANAHER et al., 2006). Desta forma, com a hidrogenação dos carbonos C-22 e C-23 da abamectina obtêm-se a IVM, fármaco que apresenta uma excelente atividade antiparasitária, característica das avermectinas B1 e, ao mesmo tempo, uma baixa toxicidade, típica para as avermectinas B2 (DANAHER et al., 2006).

Uma das propriedades físico-químicas mais importantes das LMs, além de sua longa persistência no organismo, é seu grande volume de distribuição, característica comumente associada ao fato de serem moléculas semelhantes a lipídios. Isso lhes garante uma ampla distribuição nos tecidos por um longo período, além de fornecer cobertura eficiente contra endo e ectoparasitas. Assim, a lipofilicidade determina a velocidade de absorção destes compostos pelo organismo, sua distribuição e permanência no organismo (LESPINE, 2013; BATIHA, 2020).

As avermectinas são compostos altamente lipofílicos, são rapidamente absorvidas e apresentam grande volume de distribuição. A alta lipofilicidade das avermectinas favorece o depósito do fármaco no tecido adiposo do animal, tecido que, por sua vez, apresenta um baixo metabolismo, podendo acarretar uma maior persistência do fármaco no organismo e exigir períodos de carência mais prolongados para estas substâncias (MCKELLAR; GOKBULUT, 2012).

Por outro lado, animais em condições extremas, como animais lactantes, em má condição corporal ou ainda com alta carga parasitária, onde os tecidos precisam de maior aporte de energia e, onde há a mobilização de lipídios do tecido adiposo gerando ácidos graxos livres através da lipólise de triglicerídeos, pode ocorrer das LMs também serem mobilizadas como lipídios dos estoques

de gordura, contribuindo para uma diminuição do tempo de permanência plasmática do medicamento (LESPINE, 2013).

O mecanismo de ação das avermectinas ocorre em função da capacidade das LM em potencializar a ação dos neurotransmissores como o glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA). O arranjo tridimensional de funções estruturais e fragmentos moleculares que compõem as LM são reconhecidos por receptores específicos dos canais de cloreto. Ao ligar-se a estes receptores, geram uma hiperpolarização com subsequente paralisia flácida, responsável pela morte e eliminação dos parasitos (BATIHA, 2020; VERCRUYSSSE et al., 2002). A paralisia se dá em consequência da potencialização e ativação dos canais de cloro presentes nos nervos e células musculares de invertebrados, o que leva a um aumento da permeabilidade da membrana aos íons de cloreto, provocando a hiperpolarização dos nervos ou das células musculares, causando paralisia e morte do parasita (SIVILOTTI; NISTRINI, 1991; PAREDES; AGMO, 1992; KÖHLER, 2001). Para os nematódeos gastrointestinais acredita-se que a absorção transcuticular seja a mais importante (SANTARÉM et al., 2023), contudo para os parasitos hematófagos (nematódeos e artrópodes) a via oral mostra-se a principal via de absorção (MCKELLAR; BENCHAOUI; 1996).

Fatores como a disponibilidade de vários tipos de formulação, ampla margem de segurança, efeitos persistentes, bom custo-benefício, fazem com que estes produtos pertençam ao grupo dos principais medicamentos de escolha na bovinocultura de corte para o tratamento e prevenção de endo- e ectoparasitoses (VERCRUYSSSE et al., 2002; LEATHWICK et al., 2020).

1.4.1. Ivermectina

A IVM é o principal composto do grupo das avermectinas, disponível em várias formulações com diferentes vias de administração. Ela é formada por uma mistura de 80% de 22,23-diidroavermectina B_{1a} e 20% de 22,23-diidroavermectina B^{1b} (CANGA et al., 2009). A baixa hidrosolubilidade e alta lipofilicidade da IVM, solúvel na maioria dos solventes orgânicos, mas praticamente insolúvel em água (0,0004% m/v), favorecem a sua precipitação e

deposição no tecido subcutâneo e, com isso, a lenta absorção do local da injeção, resultando em uma presença prolongada na corrente sanguínea (CANGA et al., 2009). De acordo com Lifschitz et al. (2000), a presença das LMs no plasma e a localização do parasita estão intimamente correlacionadas, tornando sua partição em componentes plasmáticos fator determinante para a disposição e eficácia do fármaco (CANGA et al., 2009). Na circulação sanguínea ela se liga a albumina e lipoproteínas sendo em seguida distribuída no organismo animal. De acordo com alguns autores pode haver uma relação entre a adiposidade e o teor de colesterol plasmático com a farmacocinética da IVM. (BASSISSI et al. 2004; CRAVEN et al., 2002). Também devido a sua natureza lipofílica, a IVM é distribuída com amplo volume de distribuição (Vd) em todas as espécies animais. De acordo com Canga et al. (2009) a distribuição em bovinos é lenta, porém ampla, apresentando alto Vd e alta média de tempo de residência (MRT).

A biotransformação da IVM ocorre no fígado, seu metabolismo é mínimo sendo a maior parte do fármaco excretado de forma inalterada (CANGA et al., 2009). De fato, estudos em bovinos mostram que o componente IVM B_{1a} é o resíduo de maior quantidade em todos os tecidos mesmo após 28 dias da administração nos animais. Os principais metabólitos hepáticos da IVM são 24 hidroximetilivermectina, 3"-O-desmetil-H2B_{1a} e o componente H2B^{1b}. Entretanto, o principal resíduo encontrado nas fezes, urina, leite, bile e tecidos é o componente H2B_{1a} (FAO/WHO, 1991; ALVINERIE; GALTIER, 1995). Por ser metabolizado de forma mais rápida o componente B^{1b} é encontrado em menor quantidade (WILKINSON; POPE; BAYLIS, 1985).

Independentemente de sua via de administração, a IVM é eliminada principalmente através das fezes (90% dose administrada), sendo a bile a principal via de excreção. O restante da dose é eliminado pela via urinária e, em vacas leiteiras, através da glândula mamária; estando esta última forma de excreção relacionada à sua alta lipofilicidade (CANGA et al., 2009). A má nutrição dos animais pode interferir na farmacocinética da IVM, já que, de acordo com estudos realizados por Lifschitz *et al.* (1997), restrições na dieta podem reduzir o fluxo biliar de IVM, reduzindo, subseqüentemente, a excreção biliar deste medicamento.

As propriedades farmacocinéticas da IVM variam de acordo com a espécie em que o composto é estudado (FINK; PORRAS, 1989). De fato, os parâmetros farmacocinéticos da IVM podem variar de acordo com muitos fatores que podem influenciar a biodisponibilidade e a meia-vida do medicamento. Esses fatores, que incluem espécie, via de administração, veículo utilizado na formulação comercial, peso corporal, condição corporal, estado fisiológico e quantidade e tipo de nutrição, criam dificuldades na extrapolação de dados de uma espécie para outra (CANGA et al., 2009).

A IVM pode ser administrada pelas vias oral (VO), intramuscular (IM), subcutânea (SC), tópica, ou intraruminal (IR). Sua maior biodisponibilidade ocorre quando aplicada pela via SC, seguida da via oral. Formulações *pour-on* são também uma forma de administração que pode ser utilizada em ruminantes (BRABANDER et al., 2009); entretanto a biodisponibilidade neste tipo de formulação é baixa (GAYRARD et al., 1999). Danaher et al. (2006) relataram que resíduos de LM são mais persistentes quando o fármaco é administrado por injeção subcutânea, quando comparada à aplicação *pour on*.

A via de administração e a natureza da formulação influenciam marcadamente a disponibilidade sistêmica da IVM e sua persistência no plasma em concentrações terapêuticas (MCKELLAR; BENCHAOUI, 1996). Estudos de Lo et al. (1985) em bovinos apontaram diferenças no farmacocinética da IVM após administração SC dependendo do tipo de formulação. Assim, o uso de formulações de base aquosa resultou em maior biodisponibilidade, mas em uma meia-vida de eliminação plasmática mais curta. A meia-vida de eliminação plasmática mais longa foi observada após administração do fármaco em veículo não aquoso e foi atribuída a um processo de absorção mais lento, resultado de uma possível precipitação de IVM no local da injeção, o que limitaria a diminuição da concentração plasmática. Essa característica, na qual a taxa de absorção é mais lenta que a sua taxa de eliminação é denominada de “efeito flip-flop”.

O tipo de formulação é também um fator passível de alteração na excreção do fármaco, podendo este ocorrer de forma mais lenta em animais tratados pela via SC, com veículos não aquosos, que com veículos aquosos. A meia-vida de eliminação é 2,0 dias com veículo aquoso, 3,7 dias com veículo aquoso:glicerol-formol 50:50 v/v, e 8,3 dias com propileno-glicol: glicerol-formol 60:40 v/v (LO et

al., 1985). Além disto, a atividade antiparasitária da IVM também pode variar de acordo com o tipo de formulação do fármaco. Assim, a persistência prolongada no plasma está correlacionada com a eficácia sustentada contra endo e ectoparasitas em formulações não aquosas administradas pela via SC (CAMPBELL, 1989; FINK; PORRAS, 1989).

É amplamente conhecido que os parâmetros farmacocinéticos são basilares para o uso racional de um medicamento e, quando se considera a segurança alimentar, esses parâmetros são fundamentais para estimar as concentrações de resíduos nos tecidos comestíveis, assim como para determinar o tempo de carência necessário em animais que serão utilizados na produção de alimentos. (PALERMO-NETO; RIGHI, 2014). Considerando a mesma espécie animal, um estudo farmacocinético anterior realizado por nosso grupo de pesquisa (GOTARDO et al, 2020), o qual verificou que os parâmetros farmacocinéticos da IVM em três subespécies de bovinos: *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus* e seus cruzamentos, mostraram-se díspares, foi então o propósito da presente pesquisa verificar se os resíduos dessa avermectina apresentam concentrações variáveis nos diferentes tecidos comestíveis avaliados.

2. OBJETIVOS

Avaliar a concentração de resíduos de IVM em tecidos comestíveis de bovinos de corte.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar as possíveis diferenças na concentração de resíduos de IVM considerando-se:

- Diferentes subespécies: *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus* e seus cruzamentos (meio sangue *B. taurus taurus* x *B. taurus indicus*);
- Distintos períodos de aplicação;
- Diferentes tecidos comestíveis;
- Considerando-se o sítio de aplicação;

3. MATERIAL E MÉTODOS

São descritos abaixo os diferentes materiais e métodos empregados na realização desta Dissertação.

3.1. EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DOS RESÍDUOS DE IVM NOS DIFERENTES TECIDOS DAS DIFERENTES SUBESPÉCIES: BOS TAURUS TAURUS, BOS TAURUS INDICUS E SEUS CRUZAMENTOS

3.1.1. Animais e Informações Sobre o Manejo

Foram utilizados 60 bovinos, machos, com idade entre 24 e 36 meses, sendo 20 *Bos taurus taurus* (*Hereford*; peso médio inicial de 446 kg e idade média de 30 meses, 18 inteiros e 2 castrados), 20 *Bos taurus indicus* (Nelore; peso médio inicial de 325 kg e idade média de 27 meses, inteiros) e 20 meio-sangue (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*; *Aberdeen Angus* x Nelore; peso médio inicial de 407 kg e idade média de 27 meses, inteiros), representativos do rebanho comercial brasileiro.

Os animais Nelore e meio sangue permaneceram confinados no confinamento Boitel da empresa JBS, localizada na cidade de Castilho-SP, estado de São Paulo (coordenadas geográficas: 20°73'92" S, 51°58'39" O). Os bovinos *Hereford* foram confinados na Fazenda Santa Terezinha de propriedade do agropecuarista Miguel Lanzi, no Município de Vera Cruz, estado de São Paulo (coordenadas geográficas: 22°09'5" S, 49°48'44" O). Em ambos os locais os bovinos foram selecionados aleatoriamente, dentro de cada lote, de acordo com critérios raciais. Assim, apenas animais hípidos e com padrões raciais, bem definidos, Nelore, *Hereford* e meio sangue Angus/Nelore, foram selecionados. Nenhum dos animais escolhidos apresentava histórico de exposição a qualquer medicamento antiparasitário à base de LMs, por um período de, no mínimo, 60 dias antes do início do estudo.

Os animais foram confinados em baias coletivas com bebedouros automáticos por um período de 90 dias e receberam dieta semelhante. No

confinamento, a relação volumosa: concentrado foi de 40:60. As dietas foram formuladas de acordo com *National Research Council* (NRC, 2001) para suprirem as exigências dos animais. Os bovinos foram alimentados duas vezes ao dia, pela manhã e à tarde. A oferta de alimento foi regulada para manter no máximo 10% de sobras. Foram utilizados volumosos de alta qualidade (silagem de milho). Como concentrado energético foram utilizados grãos de milho e/ou sorgo, e grãos de soja, farelo de soja ou girassol como concentrado proteico.



Figura 1: Lote Machos do grupo *Hereford* da Fazenda Santa Terezinha.
Fonte: ROSA (2023)



Figura 2: Lote Machos meio sangue Angus x Nelore no confinamento da JBS em Castilho – SP. Fonte: ROSA (2023)



Figura 3: Lote machos anelorados no confinamento da JBS em Castilho – SP. Fonte: ROSA (2023)

3.1.2. Medicamento

Foi utilizada IVM comercialmente disponível na formulação Ivomec® 1% da indústria farmacêutica Boehringer Ingelheim (Part: BB105/20, Lote: 148603-004). O medicamento foi administrado na dose de 200µg/kg, por via SC, na região da tábua do pescoço, conforme recomendação da bula. Foram utilizadas seringas e agulhas hipodérmicas 40x1,2mm descartáveis, posicionadas sob a pele solta num ângulo de 45°, garantindo a administração subcutânea. Para delimitar e padronizar o sítio de aplicação foi utilizado um esquadro. O esquadro foi posicionado na borda dorsal do pescoço, e o fármaco foi administrado 20cm abaixo desta, na região cervical do músculo trapézio.

3.1.3. Procedimentos

São apresentados os diferentes procedimentos realizados, divididos em tópicos, para melhor compreensão, sendo os mesmos aprovados pela comissão de bioética da FMVZ/USP, protocolado com o número 3897180221.

3.1.3.1. Avaliação coproparasitológica

Para a realização do exame coproparasitológico dos bovinos empregados nesse estudo, procedeu-se à coleta das fezes diretamente do reto dos animais, sempre no período matutino. O exame foi realizado no laboratório do Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX-FMVZ-USP), segundo a técnica de Gordon e Whitlock, descrita por Ueno e Gonçalves (1998).

3.1.3.2. Avaliação clínica e pesagem

Os animais foram submetidos à avaliação clínica, no início do delineamento experimental, sendo aferidas a temperatura corpórea, coloração de mucosas, as frequências cardíaca e respiratória e os movimentos ruminais. Todos os bovinos foram pesados em tronco de contenção acoplado à balança no dia da administração da IVM e, um dia antes do abate. As avaliações foram realizadas sempre no período matutino.

3.1.3.3. Coleta de Sangue

O sangue dos bovinos foi coletado por punção da veia jugular, sempre no período matutino. A coleta foi realizada com BD *Vacutainer*[®] sem anticoagulante para obtenção do soro, e com anticoagulante para obtenção do sangue total. Para coleta, os animais foram contidos em tronco de contenção.

3.1.3.4. Dosagem de enzimas, componentes sanguíneos e hemograma

As amostras de sangue coletadas em tubos com anticoagulante foram mantidas refrigeradas e posteriormente utilizadas para realização do hemograma em contador automático de células (Vet ABC[®] *Animal Blood Counter* – Horiba), procedimento realizado no laboratório do CEPTOX um dia após a coleta.

As amostras de sangue coletadas em tubos sem anticoagulante foram mantidas refrigeradas e centrifugadas a 3500rpm por 15min para obtenção do soro. Após a centrifugação, o soro foi armazenado em tubos *safe-lock* (Eppendorf[®]) e mantidos à temperatura de -20°C . O soro foi enviado para o laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia (VPT-FMVZ-USP) para a realização da dosagem dos níveis séricos de glicose, colesterol, creatinina, ureia, albumina, proteína total, fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT), empregando-se, para tal, kits comerciais específicos (Bioclin[®]) e analisador automático de bioquímica (Chem Well[®]-T).

3.1.3.5. Determinação da concentração plasmática de IVM

Amostras de sangue coletadas em tubos com anticoagulante foram mantidas refrigeradas e centrifugadas a 3500rpm por 15min para obtenção do plasma. Após a centrifugação, o plasma foi armazenado em tubos *safe-lock* (Eppendorf[®]) e mantidos à temperatura de -20°C até o momento da análise.

3.1.3.6. Abate, desossa, coleta e preparo de amostras para determinação da concentração tecidual de IVM

Um dia antes do abate todos os animais foram transportados para o abatedouro/frigorífico da JBS no município de Lins – SP, onde permaneceram nos currais, em dieta hídrica, separados por lotes de subespécies. O abate de todos os animais ocorreu no mesmo dia e seguiu as normas estabelecidas pela Instrução Normativa nº 3, de 17 de janeiro de 2000, do MAPA.

Logo após o abate, antes da retirada dos brincos, todos os animais foram devidamente identificados nos quartos traseiros e dianteiros com intuito de assegurar a rastreabilidade das amostras durante as operações de abate e desossa.

Na linha de abate foram coletadas amostras de (1) fígado, (2) sítio de aplicação (*Trapezius cervicalis*) e (3) contralateral (*Trapezius cervicalis*), bem como (4) rim e (5) gordura perirenal de todos os animais. Durante o procedimento de desossa, foram coletadas amostras do (6) músculo *Longuissimus dorsi* (contrafilé) de todos os bovinos e do (7) músculo *rhomboideus* (cupim) dos animais do grupo Nelore e dos meio sangue Angus-Nelore.



Figura 4 - Linha de abate, coleta de fígado ROSA (2023)



Figura 5 - Linha de abate, coleta de fígado e sítio de aplicação/ contralateral (ao fundo).
Fonte: ROSA (2023)



Figura 6 - Linha de abate: coleta do rim e gordura perirenal. Fonte: ROSA (2023)



Figuras 7 e 8 - Procedimento de desossa, coleta do cupim. Fonte: ROSA (2023)

Todo material coletado foi levado ao laboratório de pesquisa e desenvolvimento da JBS, localizado dentro da unidade do frigorífico em Lins, onde procedeu-se a aliquotagem de 200g de cada amostra tecidual coletada, bem como a identificação e o acondicionamento em sacos plásticos para estocagem em temperatura de -20°C até o momento da análise.



Figura 9 - Amostras de cupim aliquotadas e identificadas.
Fonte: ROSA (2023)

3.1.3.7. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

As amostras de plasma e tecidos foram enviadas para o Laboratório de Análise de Resíduos, da Rede de Laboratórios Nacionais Agropecuários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO-MAPA) na cidade de Porto Alegre/RS, para extração e quantificação do resíduo marcador (22,23 Dihidroavermectina- B_{1a} utilizando-se, para tal, LC-MS/MS, conforme proposto por RÜBENSAM e colaboradores (2013) e descrito a seguir.

3.1.3.7.1. Padrões e reagentes

Os padrões de IVM e benzoato de emamectina com pureza superior a 81% foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A acetonitrila (ACN) e ácido acético grau de HPLC foram adquiridos da J.T. Baker Phillipsburg, NJ, EUA). O acetato de amônio foi obtido da Mallinckrodt-Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Soluções estoque individuais na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ foram

preparadas por dissolução de 10 mg de base IVM e do padrão sólido em 10 mL de ACN. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição de alíquotas da solução de fortificação ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) em ACN para a obtenção das concentrações para os pontos inferiores a 25 ng mL^{-1} da curva de calibração. Para as concentrações superiores utilizou-se a solução intermediária ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Isso foi aplicado ao padrão interno (emamectina). As concentrações das soluções de trabalho de IVM obtidas por diluição sequencial para atender a faixa de trabalho de $0,5$ a 100 ng mL^{-1} , distribuídos em 9 pontos. A concentração da solução de trabalho do PI foi de 5 ng mL^{-1} . Para a curva de calibração foram adicionados $10 \mu\text{L}$ de cada uma das respectivas soluções. Todas as soluções padrão foram armazenadas a -20°C em tubo de polipropileno.

3.1.3.7.2. Validação da metodologia

A validação para extensão de escopo do método usando LC-MS/MS, para a matriz plasma foi realizada de acordo com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica (MGQA, 2011) do MAPA, método acreditado pela Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro (Cgcre) à ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017. Para os tecidos foi realizado de acordo com a decisão da Comissão Europeia 2002/657/EC (EC, 2002), sendo ambos os métodos adaptados a partir de RÜBENSAM e colaboradores (2011; 2013). As características de desempenho avaliadas foram seletividade, especificidade, precisão, exatidão e recuperação. Além disso, a linearidade, limite de quantificação (LOQ) e precisão do método em termos de precisão intra e inter-dia, expresso como coeficiente de variação (CV%), também foram determinados.

3.1.3.7.2.1. Seletividade

A seletividade foi avaliada através da comparação dos cromatogramas de amostras brancas de plasma e tecidos, verificando possíveis interferentes endógenos no tempo de retenção do analito de interesse e padrão interno. Para confirmar a seletividade do método, nenhum pico com área superior a 20% da

área do limite inferior de quantificação pode ser observado nos respectivos tempos de retenção dos fármacos (BRASIL, 2012).

3.1.3.7.2.2. Linearidade e Limite de Quantificação

Para definir a relação entre concentração/resposta e linearidade do método, foram preparadas seis curvas analíticas contendo dez níveis de concentração para a IVM (0; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 75; e 100 ng/mL) com concentração de padrão interno (Emamectina) de 5 ng/mL.

De acordo com MGQA, os critérios de aceitação de desvio menor ou igual a 20% para o LOQ e de 15% para demais concentrações em relação ao valor nominal, com coeficientes de determinação superiores a 0,99.

A linearidade foi realizada estudando-se a significância da regressão e o desvio de linearidade das curvas de calibração em matriz aplicando análise de variância, considerando-se $p < 0,05$ como significativo. Os resultados suportam homogeneidade de variância (homoscedasticidade) na faixa de trabalho definida no estudo.

O limite de quantificação foi calculado de maneira experimental, respeitando os requisitos de resposta superior a 10 vezes a razão sinal/ruído ($LOQ=10 \times S/N$) e variação máxima de 20%. O LOQ obtido foi de 0,5 ng/mL. A curva de calibração para matriz plasma foi de 0,5 a 100 ng/mL, a definida para os tecidos foi de 2,5 – 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

3.1.3.7.2.3. Precisão e Exatidão

A precisão do método (precisão intra e inter-dia) foi avaliada utilizando três níveis de concentração de amostra controle de qualidade em dois dias consecutivos, designado como controle de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA), em seis determinações para cada nível, contemplando a faixa de calibração da curva analítica. Os resultados para precisão foram expressos em coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LOQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%.

A exatidão também foi determinada em dois dias consecutivos utilizando amostras do LOQ, CQB, CQM e CQA. Para determinar a exatidão do método foi avaliado o grau de concordância entre os resultados obtidos pelo ensaio e os valores nominais, que não devem exceder 20% para o LOQ e 15% para os outros pontos. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Os valores de precisão do método foram satisfatórios com um CV% intra-dia inferior a 7,7% para o fígado, o qual foi realizado como extensão de escopo, ou seja, foi realizado apenas um lote em um único dia, com veracidade de 107,2%. Para o músculo os valores foram inferiores a 11,5% de CV% intra-dia e inferiores a 27,6% inter-dia, com veracidade de 100,3%. Não foram realizadas validações para a gordura.

3.1.3.8. Extração da 22,23 Dihidroavermectina-B_{1a} plasmática

A extração foi realizada por meio do método de precipitação utilizando acetonitrila, empregando alíquotas de 300 µL de plasma. Visando obter a melhor condição de extração e remoção de interferentes de matriz, foram adicionadas alíquotas sequenciais de acetonitrila seguidas de agitação vigorosa em vórtex por cerca de 15s. Alíquotas de 100 µL foram adicionadas em três etapas seguidas de uma alíquota de 300 µL. Cada adição seguida de agitação em vórtex. Para obtenção do extrato, foi realizada centrifugação à 12.000 xg por 10 minutos à temperatura de 5°C. Um volume de 700 µL foi transferido para vials e submetido à análise por LC-MS/MS.

3.1.3.9. Extração da 22,23 Dihidroavermectina-B_{1a} nos diferentes tecidos

As amostras de cada tecido coletado (200 gramas) foram individualmente trituradas, homogeneizadas e subdivididas em alíquotas de 5g, as quais foram acondicionadas em tubos de polipropileno de 50 mL. A extração foi realizada por meio do método de precipitação utilizando acetonitrila, empregando 5 gramas de amostra. Assim, adicionou-se 2,5 mL de água em cada amostra de fígado, músculo e gordura homogeneizada e misturara com Vortex. Deixou-se em

repouso por 10 minutos. Adicionou-se 2,5 mL de acetonitrila e homogeneizou-se em Vortex por aproximadamente 5 segundos. Adicionou-se mais 2,5 mL de acetonitrila e agitou-se novamente. Adicionou-se mais 5,0 mL de acetonitrila e deixou-se a mistura sob agitação durante 20 minutos em mesa agitadora horizontal em 180 rpm, na temperatura ambiente. Para amostras de músculo, adicionou-se 10 mL de acetonitrila e utilizou-se o turrax. Adicionou-se aproximadamente 2,0 g de cloreto de sódio, homogeneizou-se em Vortex e agitou-se durante 10 minutos em mesa agitadora horizontal (180 rpm) na temperatura ambiente. Centrifugou-se a mistura por 5 minutos entre 3000 e 3500 rpm. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo Falcon de 15 mL e ficou em freezer por pelo menos 12h em temperatura inferior a -10 °C. Após o período do freezer, centrifugou-se a -5 °C a 4000 rpm por 3 minutos. Verteu-se cuidadosamente a fase líquida (solvente) para um novo tubo Falcon de 50 mL sem tampa, evitando a transferência do material congelado. Evaporou-se completamente o solvente em banho-maria, sob fluxo de nitrogênio ou ar comprimido, a aproximadamente 50°C. Adicionou-se 1,0 mL de acetonitrila nos demais tubos, agitou-se a 180 rpm em mesa agitadora horizontal por 5 minutos e, transferiu-se o extrato para um vial para a análise por LC-MS/MS.

3.1.3.9.1. Dados Instrumentais para quantificação da 22,23Dihidroavermectina-B_{1a}

As análises foram realizadas utilizando um sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Tandem (LC-MS/MS). O sistema é composto por cromatógrafo líquido Agilent, modelo 1260 Infinity II (Santa Clara, CA, EUA) equipado com bomba quaternária, desgaseificador, amostrador automático, e forno de coluna, acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo, *Applied Biosystems*, modelo API 5000 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) com fonte de ionização por *eletrospray* (ESI), operando no modo positivo. Os parâmetros dependentes da fonte otimizados foram: voltagem do capilar (*ionspray voltage*), temperatura da fonte, gás de colisão (*collision gas, CAD*), gás de nebulização (*nebulizer gas, GS1*), gás de secagem (*dryer gas, GS2*), sendo os valores utilizados 4500 V, 500° C, 6psi, 55 psi, 55 psi, respectivamente. Os parâmetros dependentes do composto

otimizados foram voltagem no orifício de entrada (*decluster potential, DP*), potencial de entrada (*entrance potential, EP*), energia de colisão (*collision energy, CE*) e potencial de saída da célula de colisão (*collision cell exit potential, CXP*) sendo o tempo de permanência (*dwel time*) de 200 ms. Os íons foram monitorados no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) sendo 892,5>307,3 (DP 71V; CE 33V; EP 10V; CXP 34V) e 892,5>569,4 (DP 71V; CE 24V; EP 10V; CXP 20V) as transições de quantificação e confirmação da IVM, respectivamente. Para o padrão interno emamectina 886,1>158,0 (DP 76V; CE 57V; EP 10V; CXP 24V).

A separação foi realizada em uma coluna Phenomenex Luna C18 (50 mm x 2 mm, i.d., 3 µm), precedida por uma coluna de guarda (4mm x 3 mm i.d.) com o mesmo material (Phenomenex, Torrance, CA, EUA), usando fase móvel consistindo em água (A), ACN (B), ambos contendo 5 mM de acetato de amônio e 0,1% de ácido acético, em modo gradiente, fluxo de 0,5 mL min⁻¹. O gradiente foi programado para começar com uma composição de fase móvel de 45% de B, aumentando para 100% em 3 min, permanecendo até 6 min retornando a condição inicial em 7 min e permanecendo até 10 min. O volume de injeção foi de 2 µL para fígado, músculo e gordura, e 10 µL para plasma, sendo a coluna mantida a 40°C.

3.1.4. Delineamento experimental

Foram utilizados 60 bovinos, sendo 20 *Bos taurus taurus* (Hereford), 20 *Bos taurus indicus* (Nelore) e 20 meio sangue (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*; Aberdeen Angus x Nelore). Os animais foram separados em três grupos por subespécies, e alojados conforme descrito no item 3.1.1.

Ao início do experimento os animais foram submetidos à avaliação coproparasitológica, à avaliação clínica e do ganho de peso, conforme descrito nos itens 3.1.3.1 e 3.1.2.2, bem como à coleta de sangue para dosagem de enzimas, componentes sanguíneos e hemograma, conforme descrito nos itens 3.1.3.3 e 3.1.3.4. Após estes procedimentos, os animais receberam a IVM 1%, como descrito no item 3.1.2. Ainda, coletou-se o sangue dos bovinos para

obtenção do plasma para dosagem dos níveis de IVM conforme descrição apresentada no item 3.1.3.5.

Dos animais selecionados foram coletadas as numerações dos brincos de rastreamento, e escolhidos cinco animais de cada grupo, de forma aleatória, para cada data de aplicação do fármaco (ou seja, aos 21, 28, 35 e 40 dias antes da data de abate). Após o tratamento, os animais receberam um novo brinco de identificação (D21, D28, D35, D40, mostrando os dias antes do abate que receberam a IVM). A partir do início do experimento, o tempo total de permanência dos animais no sistema de confinamento foi igual para todos os bovinos, de todas as subespécies, ou seja, 40 dias.

Todos os animais foram abatidos no mesmo dia, sendo que para tal, foram estabelecidas diferentes datas de aplicação de IVM. Dessa forma, para cada grupo (D-21, D-28, D-35 e D-40) de cada subespécie foi empregado um total de cinco animais, ou seja, 15 animais por data de aplicação da IVM, considerando as três subespécies, conforme ilustra a figura 10.

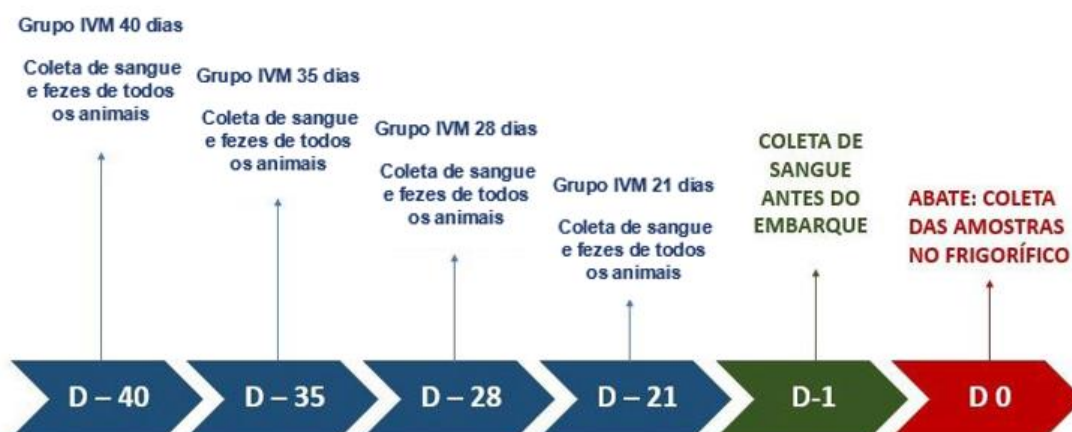


Figura 10 - Ilustração do cronograma de aplicação da IVM nos diferentes grupos para o abate de todos os animais no mesmo dia. Fonte: ROSA (2023)

3.2. EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS RESÍDUOS DE IVM NO LOCAL DE APLICAÇÃO. ESTUDO EM BOVINOS DA SUBESPÉCIE NELORE

3.2.1. Animais e Informações de Manejo

Foram bovinos adultos, machos, da subespécie Nelore (*Bos taurus indicus*), oriundos do confinamento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA/USP- no Município de Pirassununga, SP. Os animais tinham entre 30 e 48 meses no início do experimento e foram mantidos exclusivamente em sistema de confinamento. Suas dietas supriam as exigências dos animais em acordo com o *National Research Council* (NRC, 2001). Todos os animais tinham livre acesso à água.

3.2.2. Medicamento e corantes

Foi utilizada IVM comercialmente disponível na formulação Ivomec® 1% da indústria farmacêutica Boehringer Ingelheim (Part: BD8238/21, Lote: 148078-004). O medicamento foi administrado na dose de 200µg/kg, por via SC, na região da tábua do pescoço, conforme recomendação da bula. Foram utilizadas seringas e agulhas hipodérmicas 40x1,2mm descartáveis, posicionadas sob a pele solta num ângulo de 45°, garantindo a administração subcutânea. Para delimitar e padronizar o sítio de aplicação foi utilizado um esquadro. O esquadro foi posicionado na borda dorsal do pescoço, e o fármaco foi administrado 20cm abaixo desta, na região cervical do músculo trapézio.

Como corante para formulação farmacêutica utilizou-se cristal de violeta (Synth) solubilizado em propileno glicol (Synth) na concentração de 1,0%. Tanto a solução de cristal de violeta como o propileno glicol foram filtrados com filtros KASVI (*Syringe Filters* – K18-230) antes de serem acrescentados aos frascos de IVM. Como marcador do ponto de aplicação foi utilizada a tinta nanquim preta (Renylab).

3.2.3. Procedimentos

Da mesma forma que já descrito para o Experimento 1, em todos os 15 animais deste experimento também foram realizados: Avaliação coproparasitológica (3.1.3.1.), Avaliação clínica e pesagem (3.1.3.2.), Coleta de Sangue (3.1.3.3.), Dosagem de enzimas, componentes sanguíneos e hemograma (3.1.3.4.).

3.2.3.1. Preparo do medicamento e marcação do ponto de aplicação

Para marcar o ponto exato da administração do medicamento a tinta nanquim preta foi administrada pela via SC (0,1mL), com seringa e agulha hipodérmica 40x1,2mm descartáveis, a 1,5cm de distância da aplicação da IVM.

Para corar a IVM 1% acrescentou-se à formulação farmacêutica, comercialmente disponível, à solução de cristal de violeta na proporção de 1 mL para cada 50 mL do medicamento (2%). Para controle negativo, ou seja, aqueles animais que não receberam a IVM com corante, acrescentou-se apenas o diluente da solução (propileno glicol) na mesma proporção. Ambas as aplicações ocorreram de forma concomitante. As figuras 11, 12 e 13 ilustram a aplicação SC do medicamento e do nanquim na tábua do pescoço dos animais.



Figura 11 - Para delimitação do sítio de aplicação 0,1ml de Nanquim (♦) foi aplicado a 1,5cm do sítio de aplicação da IVM (◆);
Fonte: ROSA (2023)



Figuras 12 e 13 - Após determinar o sítio de aplicação e acertar a distância entre as seringas, o nanquim e a IVM foram administrados SC. Fonte: ROSA (2023)

3.2.3.2. Abate, desossa, coleta e preparo de amostras

Um dia antes de completar 35 dias após a administração da IVM, todos os animais permaneceram nos currais em dieta hídrica até o momento do abate. O abate e coleta de amostras ocorreu no Matadouro da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos FZEA/USP, localizado no mesmo Campus que o confinamento.

Imediatamente após o abate e sangria dos animais foi realizada a coleta das amostras dos tecidos da região do (1) sítio de aplicação (*Trapezius cervicalis* esquerdo) e (2) contralateral (*Trapezius cervicalis* direito). Um total de nove animais foram abatidos aos 35 dias após a aplicação, os oito restantes precisaram ser abatidos no 36. dia em razão de um defeito na pistola atordoadora do matadouro escola.

Após a coleta, as amostras foram encaminhadas para o laboratório do CEPTOX para serem processadas antes de serem enviadas LANAGRO-MAPA na cidade de Porto Alegre/RS, para a realização das análises.

No laboratório do CEPTOX as amostras coletadas foram pesadas (~200g/ amostra) e processadas da seguinte forma: As amostras do contralateral foram trituradas e homogeneizadas com ajuda de um multiprocessador (Electrolux®, modelo EIB10), sendo, em seguida, pesadas alíquotas de 5g em tubos de polipropileno de 50mL e estocadas a temperatura de -20°C. As amostras do sítio de aplicação foram processadas considerando dois diâmetros: 15 cm (A) e 10cm (B), sendo o ponto tingido pelo Nanquim o centro. Do total de uma amostra foi cortada uma amostra com diâmetro 15cm (A), da qual coletamos outra com diâmetro 10cm (B).

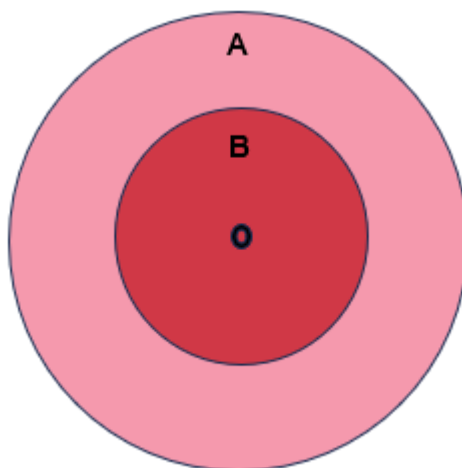


Figura 14: Sítio de aplicação (●), Amostra A - 15cm (◻), Amostra B – 10cm (◻). Fonte: ROSA (2023)

O material da amostra B foi integralmente processado com ajuda do multiprocessador (Figura 15), sendo, em seguida, pesadas alíquotas de 5g em tubos de polipropileno de 50mL e estocadas a temperatura de -20°C. O restante do material da amostra A foi igualmente processado com ajuda do multiprocessador, pesado e misturado em mesma proporção com a subamostra B. Em seguida foram coletadas outras alíquotas de 5g em tubos Falcon de 50mL e estocadas a temperatura de -20°C. Todas as amostras foram encaminhadas ao LANAGRO-MAPA/RS para a realização das análises e obtenção do resíduo de IVM.

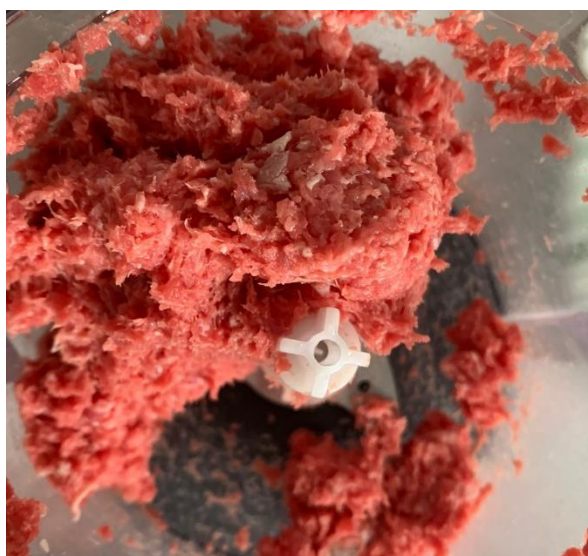


Figura 15 - Processamento das amostras de tecido no multiprocessador. Fonte: ROSA (2023)

3.2.3.3. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

O total de análises de resíduos para os dois tecidos avaliados foi de 45 amostras quantificadas, 15 amostras do sítio de aplicação com diâmetro de 10 cm, 15 do mesmo sítio considerando material da borda com diâmetro de 15cm e 15 amostras do contralateral. Da mesma forma que no Experimento 1, todas as análises laboratoriais foram realizadas pelo Laboratório do LANAGRO-MAPA/RS, localizado em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, seguindo método adaptado de Rübensam et al. (2013), conforme já descrito nos itens 3.1.3.7 – 3.1.3.9.1.

3.2.4. Delineamento experimental

Foram utilizados 15 animais da subespécie Nelore (NE) divididos em dois grupos: No primeiro grupo (G1; N=8) os animais receberam IVM acrescida da solução de cristal de violeta, conforme descrito nos itens 3.2.2. e 3.2.3.1. Os animais do segundo grupo (G2; N=7) receberam IVM acrescida de propileno glicol (itens 3.2.2. e 3.2.3.1.). Todos os bovinos receberam por via SC o nanquim (itens 3.2.2. e 3.2.3.1.).

Em nenhum dos animais havia histórico de exposição a qualquer medicamento antiparasitário à base de LMs, por um período de, no mínimo, 60 dias antes do início do estudo. A administração do fármaco ocorreu 35 dias antes do abate dos animais, de acordo com o período de carência estipulado pelo fabricante.

3.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O tamanho amostral de 60 animais foi previamente estabelecido utilizando as recomendações da Agência Europeia de Medicamentos (EMA, 2021), WHO (2009d). Para a avaliação estatística das concentrações de ivermectina nas amostras de plasma e tecido foi realizada a análise de variância (ANOVA). Para

a detecção de diferenças significantes entre os grupos, foi utilizado como teste posterior à ANOVA o teste *post hoc* de *Tukey*. Todas as análises foram realizadas usando o software online Jamovi (<https://cloud.jamovi.org/>).

Para o cálculo do período de carência foi utilizado o programa WT 1.4, um programa desenvolvido na Alemanha e adotado pelo Comité de Medicamentos Veterinários (CVMP) da EMA na União Europeia (DAMTE et al., 2012).

Valores inferiores ao limite mínimo de quantificação da técnica utilizada (concentrações $< 2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ foram definidos para metade do LOQ, ou seja, $1,25 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os valores superiores ao limite máximo da curva de calibração da técnica foram considerados integralmente.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos na quantificação dos dois experimentos deste estudo serão apresentados nos próximos tópicos, separadamente, em forma de tabelas.

4.1. EXPERIMENTO 1

4.1.1. Avaliação clínica, coproparasitológica, bioquímica e hematológica

O exame clínico realizado no início do experimento não revelou nenhuma alteração digna de nota na frequência cardíaca e respiratória, temperatura corpórea, movimentos ruminais e coloração de mucosas nos bovinos.

O exame coproparasitológico, realizado ao início do experimento, evidenciou infecção de grau leve nos bovinos Nelore e meio sangue, e de grau moderado nos bovinos *Hereford*. No que se refere à avaliação bioquímica e hematológica, verificou-se flutuações de alguns parâmetros, mas os valores mantiveram-se dentro da normalidade para a espécie (dados não apresentados).

4.1.2. Quantificação da 22,23 Dihidroavermectina-B_{1a} plasmática

A Tabela 1 mostra os níveis plasmáticos de 22,23 Dihidroavermectina-B_{1a} dos animais HER, NEL e meio-sangue NA, tratados com IVM 1%. A análise de variância revelou efeito significantes da interação tratamentos x tempo nos dados obtidos entre os diferentes grupos ($p < 0,05$). A aplicação do teste Tukey revelou um aumento significativo ($p < 0,05$) neste parâmetro nas coletas dos dias 0, 21 e 28 nos animais HER, quando comparados com os animais NE e NA. Ainda, na coleta do dia 21 observou-se diferença significativa entre os grupos NE e NA.

Tabela 1 - Média e erro padrão dos níveis plasmáticos de 22,23 Dihidroivermectina-B_{1a} (ng/mL) dos bovinos *Hereford* (HER), Nelore (NE) e meio-sangue Angus x Nelore (NA), que receberam, ivermectina 1%, por via SC, na dose de 200 µg/kg. As avaliações foram realizadas antes da administração da ivermectina (t=0) e no dia anterior ao abate, ou seja, 21, 28, 35 e 40 dias após a administração do medicamento.

Grupo	0 (20) ⁿ	21 (5)	28 (5)	35 (5)	40(5)
HER	2,9±0,38 A	16,41±3,90 A	7,88±0,73 A	2,69±0,72 A	2,43±1,13 A
NEL	0,29±0,04 B	11,5±0,40 B	3,47±0,63 B	1,84±0,25 A	1,82±0,87 A
AN	0,57±0,12 B	8,52±1,68 C	3,52±0,77 B	1,93±0,45 A	0,90±0,26 A

ⁿ Entre parênteses o número de amostras analisadas por variável. Médias e erros seguidos por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si (p>0,05; ANOVA seguida de TUKEY).
Fonte: ROSA (2023)

4.1.3. Quantificação da 22,23 Dihidroivermectina-B_{1a} nos diferentes tecidos

Os tecidos avaliados, os grupos de animais e os números de observações (N) dentro de cada tempo de administração do fármaco, bem como as estimativas de médias e erros padrão (EP) para a variável concentração de IVM 1%, são apresentados em duas tabelas. Na Tabela 2 são apresentados os dados obtidos dos 60 bovinos avaliados.

Na tabela 3 são apresentados os dados excluídos valores considerados extremos (*outliers*) pelo programa estatístico utilizado para tratamento dos dados. Devido ao número limitado de animais e à variabilidade biológica de animal para animal, a exclusão de valores *outliers* foi considerada com muito cuidado.

Tabela 2 - Média e erro padrão da concentração de 22,23 Dihidroavermectina-B_{1a} ($\mu\text{g kg}^{-1}$) dos bovinos *Hereford* (HER), Nelore (NE) e meio-sangue Angus x Nelore (NA), que receberam, ivermectina 1%, por via SC, na dose de 200 $\mu\text{g/kg}$. As avaliações foram realizadas com 21, 28, 35 e 40 dias após a administração do medicamento nas três subespécies, sem exclusão de valores extremos (N=5/grupo/tempo).

Tecido	Grupo	TEMPO (dias)							
		21		28		35		40	
Fígado	HER	131,3 \pm 27,7	A	93,5 \pm 15,7	A	71,4 \pm 38,4	A	81,9 \pm 45,5	A
	NEL	239,6 \pm 62	A	67,6 \pm 6,1	A	32,7 \pm 9,8	A	38,3 \pm 15,2	A
	AN	141,7 \pm 54,6	A	90,3 \pm 32,7	A	45,8 \pm 13,3	A	17,8 \pm 5,4	A
Gordura	HER	99,1 \pm 25,4	A	61,4 \pm 8,7	A	21,7 \pm 6,3	A	22,1 \pm 12,2	A
	NEL	62,2 \pm 4,2	A	26,4 \pm 3,8	B	11,9 \pm 1,6	A	12 \pm 6,5	A
	AN	57,5 \pm 11,2	A	21,4 \pm 4,2	B	12,0 \pm 2,7	A	5,7 \pm 1,2	A
Sítio de Aplicação	HER	580,3 \pm 474,5	A	308,1 \pm 183,2	A	58,2 \pm 33,5	A	94 \pm 68,3	A
	NEL	6,2 \pm 2,1	A	3,8 \pm 2,1	A	650,5 \pm 609,1	A	1,25 \pm 0	A
	AN	324,6 \pm 232	A	11,7 \pm 10,5	A	1,25 \pm 0	A	7,3 \pm 6	A
Contralateral	HER	28 \pm 19,7	A	5,3 \pm 0,7	A	4,9 \pm 3,6	A	12,3 \pm 6,1	A
	NEL	3,1 \pm 0,5	A	1,25 \pm 0	B	1,25 \pm 0	A	1,25 \pm 0	B
	AN	99,1 \pm 96,7	A	1,25 \pm 0	B	1,25 \pm 0	A	1,25 \pm 0	B
Rim	HER	18,8 \pm 4,6	A	10,2 \pm 0,8	A	5,8 \pm 2,2	A	6,4 \pm 3,8	A
	NEL	13,1 \pm 1,7	A	6,2 \pm 1,1	B	3,4 \pm 0,3	A	3,3 \pm 1,6	A
	AN	11 \pm 2	A	4,1 \pm 0,8	B	2,5 \pm 0,9	A	1,5 \pm 0,3	A
Contrafilé	HER	17,9 \pm 6,8	A	9,1 \pm 1,4	A	4,6 \pm 1,2	A	3,9 \pm 1,6	A
	NEL	8,6 \pm 0,8	A	4,5 \pm 0,6	B	3,3 \pm 0,3	A	2,8 \pm 1,1	A
	AN	6,8 \pm 1,1	A	4,2 \pm 0,6	B	2,8 \pm 0,4	A	1,5 \pm 0,3	A
Cupim	NEL	4,1 \pm 0,6	A	1,5 \pm 0,3	A	1,5 \pm 0,3	A	1,25 \pm 0	A
	AN	2,5 \pm 0,5	A	2,1 \pm 0,5	A	2324 \pm 2322	A	5,3 \pm 4,1	A

Médias e erros seguidos por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ($p > 0,05$; ANOVA seguida de TUKEY). Fonte: ROSA (2023)

Tabela 3 – Média e erro padrão da concentração de 22,23 Dihidroavermectina-B_{1a} ($\mu\text{g kg}^{-1}$) dos bovinos *Hereford* (HER), Nelore (NE) e meio-sangue Angus x Nelore (NA), que receberam, ivermectina 1%, por via SC, na dose de 200 $\mu\text{g/kg}$. As avaliações foram realizadas com 21, 28, 35 e 40 dias após a administração do medicamento nas três subespécies, com algumas exclusões de valores extremos (N=5/grupo/dia).

Tecido	Grupo	TEMPO (dias)							
		21		28		35		40	
Fígado	HER	131,3 \pm 27,7	A	93,5 \pm 15,7	A	71,4 \pm 38,4	A	81,9 \pm 45,5	A
	NEL	239,6 \pm 62	A	67,6 \pm 6,1	A	32,7 \pm 9,8	A	38,3 \pm 15,2	A
	AN	141,7 \pm 54,6	A	90,3 \pm 32,7	A	45,8 \pm 13,3	A	17,8 \pm 5,4	A
Gordura	HER	99,1 \pm 25,4	A	61,4 \pm 8,7	A	21,7 \pm 6,3	A	22,1 \pm 12,2	A
	NEL	62,2 \pm 4,2	A	26,4 \pm 3,8	B	11,9 \pm 1,6	A	12 \pm 6,5	A
	AN	57,5 \pm 11,2	A	21,4 \pm 4,2	B	12,0 \pm 2,7	A	5,7 \pm 1,2	A
Sítio de Aplicação	HER	107,8 \pm 56,3 ⁿ	A	308,1 \pm 183,2	A	58,2 \pm 33,5	A	94 \pm 68,3	A
	NEL	6,2 \pm 2,2 ⁿ	A	3,8 \pm 2,1	A	42,3 \pm 41 ⁿ	A	1,25 \pm 0	A
	AN	107 \pm 103,5 ⁿ	A	11,7 \pm 10,5	A	1,25 \pm 0	A	7,3 \pm 6	A
Contralateral	HER	28 \pm 19,7	A	5,3 \pm 0,7	A	4,9 \pm 3,6	A	12,3 \pm 6,1	A
	NEL	3,1 \pm 0,5	A	1,25 \pm 0	B	1,25 \pm 0	A	1,25 \pm 0	B
	AN	2,3 \pm 0,7 ⁿ	A	1,25 \pm 0	B	1,25 \pm 0	A	1,25 \pm 0	B
Rim	HER	18,8 \pm 4,6	A	10,2 \pm 0,8	A	5,8 \pm 2,2	A	6,4 \pm 3,8	A
	NEL	13,1 \pm 1,7	A	6,2 \pm 1,1	B	3,4 \pm 0,3	A	3,3 \pm 1,6	A
	AN	11 \pm 2	A	4,1 \pm 0,8	B	2,5 \pm 0,9	A	1,5 \pm 0,3	A
Contrafilé	HER	17,9 \pm 6,8	A	9,1 \pm 1,4	A	4,6 \pm 1,2	A	3,9 \pm 1,6	A
	NEL	8,6 \pm 0,8	A	4,5 \pm 0,6	B	3,3 \pm 0,3	A	2,8 \pm 1,1	A
	AN	6,8 \pm 1,1	A	4,2 \pm 0,6	B	2,8 \pm 0,4	A	1,5 \pm 0,3	A
Cupim	NEL	4,1 \pm 0,6	A	1,5 \pm 0,3	A	1,5 \pm 0,3	A	1,25 \pm 0	A
	AN	2,5 \pm 0,5	A	2,1 \pm 0,5	A	2 \pm 0,7 ⁿ	A	5,3 \pm 4,1	A

ⁿ Número de amostras analisadas igual a quatro, devido a exclusão dos valores *outliers*. Médias e erros seguidos por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ($p > 0,05$; ANOVA seguida de TUKEY). Fonte: ROSA (2023)

Todos os sete tecidos foram analisados quanto à concentração de IVM visando detectar possíveis diferenças considerando-se as subespécies e os períodos de aplicação avaliados. Embora não tenha sido realizada análises estatísticas da IVM entre os diferentes tecidos considerando-se o mesmo cruzamento pode-se verificar grande variação dentre os tecidos analisados. Neste sentido, observa-se que alguns tecidos como rim, contrafilé, contralateral e cupim apresentaram concentrações máximas bem menores que as demais matrizes, como fígado, gordura e sítio de aplicação.

Conforme pôde ser observado na Tabela 2 e 3, a análise de variância revelou efeito significativo nos dados obtidos entre as diferentes subespécies ($p < 0,05$) no tempo 28 dias nas matrizes gordura, rim e contrafilé. A aplicação do teste Tukey detectou um aumento significativo da concentração tecidual de 22,23

Dihidroavermectina-B_{1a} nos animais HER, quando comparado com os AN e NEL. Da mesma forma, o tecido contralateral nos bovinos do grupo *Hereford* também diferiu estatisticamente do dos animais dos grupos Nelore e meio sangue nos tempos 28 e 40 após a aplicação da IVM ($p < 0,05$). Nas demais matrizes analisadas não foram observadas diferenças significantes entre os três grupos, nos diferentes tempos avaliados ($p < 0,05$).

As médias das concentrações de IVM foram $< LQ$ ($< 1,25 \mu\text{g kg}^{-1}$) ao longo de 3 dos 4 períodos avaliados (35, 28 e 21 dias após a aplicação) no tecido contrafilé para os bovinos dos grupos Nelore e meio sangue. Ainda, a média dos resíduos de IVM também se mantiveram abaixo do LQ nos tecidos sítio de aplicação nas subespécies Nelore (tempo 40) e meio sangue (tempo 35), e no cupim dos animais do grupo Nelore (tempo 40).

Os resultados demonstraram, portanto, que os níveis de 22,23 Dihidroavermectina-B_{1a} encontrados nos diferentes tecidos dos animais deste estudo mantiveram-se abaixo do LMR na maior parte das coletas nos diferentes períodos avaliados com poucas exceções. Neste sentido, observou-se que para a matriz sítio de aplicação na subespécie *Hereford* o LMR foi extrapolado em todos os períodos avaliados. Nos bovinos Nelore o LMR foi excedido no ponto de aplicação apenas aos 35 dias após a aplicação do medicamento. Os animais meio-sangues apresentaram níveis de IVM acima do LMR no ponto de aplicação e contralateral aos 21 dias após a administração e no cupim aos 35 dias após administração da IVM.

A tabela 4 apresenta os períodos de carências calculados com o programa WT 1.4. As carências obtidas, para todos os tecidos e tratamentos foram inferiores àquele estipulado pelo fabricante do fármaco utilizado neste estudo. A alta variabilidade dos dados e grande quantidade de detecções abaixo do LQ inviabilizaram o cálculo do período de carência em todos os grupos para as matrizes sítio de aplicação e contralateral. Da mesma forma, o cálculo para o tecido cupim nos animais meio sangue também não foi viável. Nos demais tecidos (Fígado, gordura, rim e contrafilé) os maiores períodos de carência foram detectados para animais da subespécie *Hereford*, seguido pelos bovinos Nelore e meio sangue Angus-Nelore.

Tabela 4 - Períodos de carência (dias) calculados com ajuda do software WT1.4, considerando cada tecido e subespécie.

TECIDO								
TRAT	N	Fígado	Gordura	Sítio Aplicação	Contralateral	Rim	Contrafilé	Cupim
HER	20	30	26	*	*	24	29	-
NEL	20	26	18	*	*	14	12	6
AN	20	23	17	*	*	14	7	*

(*) Não foi possível a obtenção dos valores pelo programa, (-) Tecido Cupim foi avaliado somente nos animais Nelore e meio-sangue. Fonte: ROSA (2023)

4.2. EXPERIMENTO 2

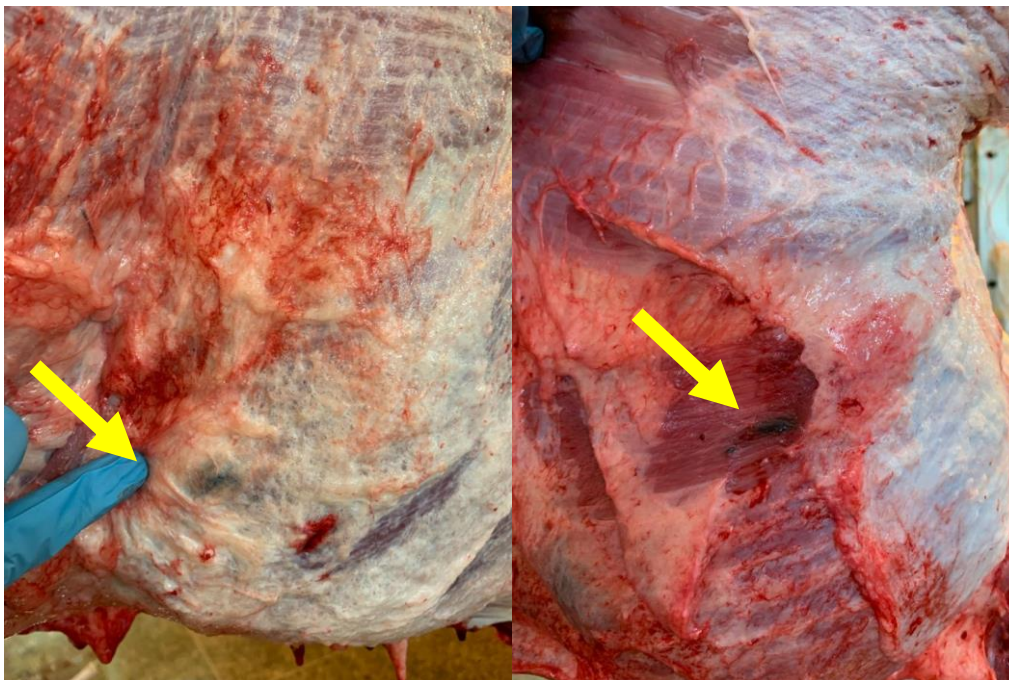
4.2.1. Avaliação clínica, coparasitológica, bioquímica e hematológica

O exame clínico realizado no início do experimento não revelou nenhuma alteração digna de nota na frequência cardíaca e respiratória, temperatura corpórea, movimentos ruminais e coloração de mucosas nos bovinos.

O exame coparasitológico evidenciou grau de infecção leve em todos os animais. No que se refere à avaliação bioquímica e hematológica, verificou-se flutuações de alguns parâmetros, mas os valores mantiveram-se dentro da normalidade para a espécie.

4.2.2. Delimitação do sítio de aplicação

A adição do cristal de violeta à IVM e a administração concomitante do nanquim foi com o intuito de delimitar e padronizar o sítio de aplicação, conferindo melhor exatidão no momento da coleta do tecido. As figuras 16 e 17 ilustram a dispersão dos corantes no tecido muscular da tábua do pescoço, demarcando o ponto exato da administração do medicamento.



Figuras 16 e 17 - Coleta de amostra durante abate no abatedouro escola. Áreas enegrecidas na carcaça do animal, na região da tábua do pescoço, oriundas da administração do cristal de violeta e do nanquim concomitante à administração da IVM para determinação do sítio de aplicação. Fonte: ROSA, 2023

As figuras 18 e 19 exemplificam a dispersão da IVM no tecido animal após a administração da IVM pela via subcutânea. De maneira geral, os corantes tendiam a se alojar na gordura e fascias intermusculares, não causando nenhum dano visível à musculatura do animal.



Figuras 18 e 19 – Coleta de amostras e subamostras A e B para quantificação da IVM no sítio de aplicação. Ponto indicado pela seta foi o local da administração da IVM e dos corantes. Fonte: ROSA, 2023

4.2.3. Quantificação da 22,23 Dihidroivermectina-B_{1a} nos sítios de aplicação e contralateral

Os resultados das análises de quantificação da IVM nas duas amostras oriundas da região do sítio de aplicação, bem como do contralateral foram abaixo do LQ para todos os animais, com exceção do animal 11, que apresentou altos níveis de Dihidroivermectina-B_{1a} nas duas amostras da região do sítio de aplicação.

Tabela 5 – Concentração de 22,23 Dihidroivermectina-B_{1a} ($\mu\text{g kg}^{-1}$) nas amostras A, B e no tecido contralateral dos bovinos Nelore (NE) que receberam, ivermectina 1%, por via SC, na dose de 200 $\mu\text{g/kg}$ com (1-8) e sem (9-15) cristal de violeta. A avaliação foi realizada 35 dias após a administração do medicamento nos animais.

Animal	Amostra A	Amostra B	Contralateral
	10 Ø	15 Ø	
1	1,25	1,25	1,25
2	1,25	1,25	1,25
3	1,25	1,25	1,25
4	1,25	1,25	1,25
5	1,25	1,25	1,25
6	2,82	2,52	1,25
7	3,31	1,25	1,25
8	1,25	1,25	1,25
9	1,25	1,25	1,25
10	1,25	1,25	1,25
11	1162,03	629,93	1,25
12	1,25	1,25	1,25
13	1,25	1,25	1,25
14	1,25	1,25	1,25
15	1,25	1,25	1,25

Ø Diâmetro (cm)

5. DISCUSSÃO

O presente estudo procurou fechar uma pesquisa mais ampla, iniciada há, aproximadamente, 10 anos, quando em nosso laboratório recebemos alguns auditores fiscais do MAPA, solicitando-nos desenvolver um protocolo para a comparação entre a farmacocinética da IVM em duas subespécies de bovinos, o *Bos taurus taurus*, subespécie, na qual foram conduzidos os estudos para registro desse medicamento, e o *Bos taurus indicus*, e raças mestiças, que representam cerca de 80% do rebanho bovino do Brasil (ACNB, 2023). Posteriormente, seriam realizados estudos para o estabelecimento do período de carência. Tal solicitação por parte do MAPA se deveu aos embargos que a carne proveniente do Brasil estava sofrendo, devido aos LMR além do que aqueles permitidos por alguns países. Nesse sentido, esse Ministério vinha realizando uma série de medidas para reverter tal situação, procurando verificar, portanto, se a diferença entre subespécies faria com que houvesse desconformidade na depleção, alterando assim o período de carência para o abate do animal.

Embora tivesse sido redigido todo o projeto de pesquisa, esse estudo não foi concretizado devido a uma série de motivos, políticos e econômicos. Assim sendo, não obstante a inviabilidade dessa parceria naquele momento, nosso grupo de pesquisa verificou a enorme relevância para o país na execução desta pesquisa, haja vista que seria possível gerar dados de extrema importância para a pecuária nacional, pois revelaria o comportamento farmacocinético (e o consequente perfil do período de carência), não somente da IVM, mas também permitiria indicar se os dados de estudos farmacocinéticos, bem como de depleção de resíduos, dos diferentes medicamentos, os quais são gerados usualmente em gado europeu, seriam ou não dissonantes daqueles parâmetros que seriam obtidos no gado azebuado. Essa checagem permitiria determinar a precisão das projeções feitas a partir dos estudos sobre ambos os tipos de gado. O objetivo, portanto, seria o de assegurar a confiabilidade dessas extrapolações e evitar erros que possam resultar em concentrações de resíduos nos animais tratados acima dos LMRs, o que poderia comprometer a saúde humana.

Está muito bem estabelecido que alguns fatores ligados aos animais têm implicação direta no perfil farmacocinético de uma substância e, por conseguinte, podem afetar sobremaneira, por exemplo, o tempo de permanência do fármaco no organismo. Assim, características tais como condição corporal, estado fisiológico, tipo de alimentação e sexo, devem ser homogeneizadas no estudo, para não serem variáveis que significativamente interferem no resultado. Particularmente, em relação à IVM, essas variáveis já são bem estabelecidas (MCKELLAR; BENCHAOUI, 1996; LANUSSE et al., 1997; LIFSCHITZ et al., 2004; CANGA et al., 2007).

Outro ponto fundamental em relação ao comportamento farmacocinético de um medicamento, principalmente em se tratando de um antiparasitário, se refere à infecção parasitária do animal. Nesse sentido, duas pesquisas conduzidas com avermectinas diferentes, em ovinos parasitados por nematódeos gastrintestinais, concordaram ao verificar que animais parasitados apresentam valores nos parâmetros farmacocinéticos completamente diferentes entre animais altamente parasitados ou não, concluindo que aqueles ovinos com grande infestação apresentaram muito menor biodisponibilidade às LMs que em animais sem carga parasitária elevada (LESPINE et al., 2004; PEREZ, 2006). Particularmente em relação à IVM, um estudo conduzido por Echeverría et. al. (2002), também em ovinos, deixou patente que a alta infestação parasitária acarreta diferenças significantes nos parâmetros farmacocinéticos dessa avermectina.

Ainda, considerando-se a higidez dos animais, é também inequivocamente demonstrado que a alteração na função hepática e renal tem um impacto direto no perfil farmacocinético de um medicamento (TREPANIER 2013; PALATINI, 2016).

Portanto, para a presente pesquisa foram escolhidos animais, que à avaliação clínica se mostraram em bom estado de higidez e antes de ser finalizada a escolha dos animais para cada grupo experimental, foram realizadas as avaliações coparassitológicas, bem como o hemograma completo e a avaliação da função hepática e renal, de cada um dos animais; sendo que a

análise de todos esses dados, mostrou não haver nenhuma intercorrência que poderia interferir na farmacocinética da IVM.

Outra variável que pode interferir na avaliação do comportamento farmacocinético de uma substância é o gênero. De fato, é abundante o número de estudos que aponta valores significativamente diferentes quando se comparam os sexos (CZERNIAK, 2001; MEIBOHN et al., 2002); assim, embora um estudo anterior, realizado pelo nosso grupo estudando o comportamento farmacocinético da IVM em bovinos não apontasse para disparidades sexuais, em qualquer um dos parâmetros farmacocinéticos avaliados (GOTARDO et al., 2020), decidiu-se nesta pesquisa manter a homogeneidade de gênero, empregando-se apenas bovinos machos. Esse procedimento permitiria que se evitasse, por exemplo, alguma disparidade entre os sexos na depleção tecidual da IVM, interferindo na interpretação dos resultados relativos aos resíduos nas diferentes matrizes analisadas. Essas mesmas avaliações foram realizadas na segunda etapa da presente pesquisa, no qual se objetivou verificar o resíduo da IVM no local de aplicação e da mesma maneira que o aqui verificado, os animais apresentaram-se saudáveis e aptos para a realização da pesquisa.

Na primeira fase deste estudo, foram avaliados os níveis plasmáticos IVM, nas duas subespécies: *Hereford* e Nelore e o cruzamento entre gado europeu e indiano. Para tal, empregou-se a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Tandem (LC-MS/MS). Essa técnica específica é utilizada no Plano de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal do MAPA, com todas as análises sendo conduzidas no Laboratório Nacional Agropecuário em Porto Alegre (LANAGRO/RS), local onde foram realizadas as Quantificações da 22,23 Dihidroavermectina-B_{1a}, tanto no plasma quanto nos tecidos. A validação desta metodologia no LANAGRO já foi detalhada anteriormente por Rübensam et al. (2013).

Um fato que chama a atenção é a detecção da IVM no tempo zero, em todos os animais, das três subespécies aqui analisadas. Similarmente, um estudo anterior conduzido por nosso grupo também revelou a presença desta avermectina no início da análise nos três cruzamentos examinados (GOTARDO

et al., 2020). Estes resultados, consistentes em ambos os estudos, sugerem, em primeiro lugar, a alta sensibilidade do método utilizado e, em segundo, que todos os animais tiveram contato prévio com a IVM, embora o momento exato dessa exposição não possa ser determinado.

Interessantemente, ao comparar os dados plasmáticos de 22,23 Dihidroavermectina-B_{1a} dos dois estudos, observa-se uma disparidade notável. No estudo anterior de Gotardo et al. (2020), foram usados animais Tabapuã e Angus, representando, respectivamente, o gado zebuínio e bovinos de origem europeia. Naquele estudo, os animais da subespécie Tabapuã apresentaram níveis plasmáticos mais elevados da avermectina. No entanto, nesta pesquisa atual, observou-se o oposto: os bovinos de origem europeia (subespécie Angus) exibiram níveis mais altos do composto em comparação com os animais de origem indiana.

Nesse momento, pouco pode ser especulado a respeito desta discrepância de dados entre os dois estudos; contudo, nesta pesquisa, foi observado que, já no tempo zero de coleta, os bovinos da subespécie *Hereford* apresentavam níveis de IVM dez vezes superiores aos dos bovinos de origem indiana, um resultado inesperado. Portanto, uma possibilidade é de que embora as respostas ao questionário que foi aplicado anteriormente, em cada propriedade, indicaram categoricamente que nenhum dos animais que seriam utilizados na pesquisa havia sido exposto à IVM pelo menos nos dois meses antes deste estudo, é provável que os animais de origem europeia possam ter recebido a avermectina em uma data próxima ao início do estudo; porém a informação fornecida foi incorreta. De fato, enquanto os animais de origem indiana e os meio-sangue eram pertencentes ao confinamento da JBS, que possui um rigoroso programa de controle de parasitas, com cronograma de administração de medicamentos muito bem estabelecido e controlado, não foi verificado tal austeridade na propriedade onde estavam lotados os animais *Hereford*. Nesse sentido, e considerando-se que é amplamente conhecido que subespécies europeias são bem mais sensíveis à infecção parasitária que aqueles de origem zebuína (GRISI et al., 2014), é possível supor que em algum momento, próximo à administração da IVM para esta pesquisa, os animais

possam ter manifestado sinais de infecção parasitária, com subsequente emprego do medicamento.

Outra hipótese para se explicar essa diferença observada nos níveis plasmáticos de IVM entre os dois estudos pode estar relacionada às distintas subespécies analisadas. No estudo atual, foram examinadas bovinos *Hereford* e *Nelore*, enquanto o estudo anterior foi empregado bovinos das subespécies *Angus* e *Tabapuã*. Portanto, mesmo que ambos os estudos tenham comparado subespécies de origens europeias e indianas, as variações específicas entre essas subespécies podem ser um fator significativo a ser considerado.

Considerando-se a quantificação do 22,23 Dihidroavermectina-B_{1a} nos tecidos, constata-se uma variação entre as diferentes matrizes avaliadas, o que seria o esperado (FAO/WHO, 2015), haja vista que reflete os padrões diferenciados de distribuição de resíduos em cada tecido. Assim, alguns tecidos apresentaram concentrações máximas mais baixas que outros, como é o caso do contralateral e do rim. O fígado, sítio de aplicação e gordura apresentaram valores mais elevados, fato que pode ser explicado pela característica lipofílica da IVM, importante na modulação de sua farmacocinética (absorção, distribuição, biotransformação e eliminação), bem como na sua taxa de troca entre os tecidos e a corrente sanguínea (HOUSHAYMI et al., 2018).

Um estudo mostra que, como a maioria dos medicamentos lipofílicos, as avermectinas se ligam às lipoproteínas plasmáticas e estão principalmente associadas às lipoproteínas plasmáticas de alta densidade (HOUSHAYMI et al., 2018); portanto, os valores de concentração residual mais elevados no fígado são também consequência do transporte reverso do colesterol para metabolização de complexos formados entre este último e a IVM (BASSINI et al., 2004; LESPINE, 2009; 2013).

Além disso, os resultados obtidos neste estudo estão em consonância com a hipótese apresentada por Brossi (2018), a qual propõe que o grau de lipofilicidade do fármaco influencia a afinidade pelo tecido adiposo. Porém, apesar da lipofilicidade das LM ser uma das propriedades centrais que ditam a

cinética destes fármacos, afetando sua capacidade de serem armazenados nos tecidos adiposos e na partição dentro das membranas lipídicas (LESPINE, 2013), notavelmente, os valores de concentrações máxima de resíduos encontrados no cupim, tecido que sabidamente concentra altos níveis de gordura (PEDRÃO et al., 2009), foram bastante baixos (Tabela 2). Uma possível explicação para este achado inesperado pode estar relacionada ao fato de haver uma menor taxa de vascularização deste tecido quando comparada aos outros aqui analisados (GASPAROTTO et al., 2011), o que compromete a chegada (e a consequente deposição) da avermectina neste tecido.

Todos os sete tecidos foram analisados quanto à concentração de IVM visando a obter indícios sobre possíveis diferenças considerando-se as subespécies e períodos de aplicação avaliados, sendo esse o principal objetivo do presente estudo. Entretanto, tal comparação ficou significativamente comprometida, pois chamam a atenção os valores elevados dos erros-padrão da grande maioria das médias obtidas nos diferentes tecidos, nos três grupos de bovinos. À título de exemplo: nos animais da subespécie *Hereford*, a média dos níveis de IVM no sítio de aplicação, no 21º dia após a administração do fármaco, foi de 580,34 e o erro padrão calculado de aproximadamente 475 (Tabela 2). Quando, por meio do programa estatístico Jamovi (<https://cloud.jamovi.org/>) se excluiu um valor extremo (*outlier*), o valor da média caiu para 107,79, com o erro-padrão de aproximadamente 56 (Tabela 3).

Além disso, ao utilizar o *software* WT1.4 da EMA (EMA, 2021) para calcular o período de carência da IVM nos diferentes tecidos analisados, observou-se a impossibilidade de realizar muitos dos cálculos. Isso ocorreu devido à não conformidade com as premissas exigidas pelo programa. De maneira sucinta, as condições necessárias para a análise adequada dos dados nesse software, conforme estabelecido pelo guia, incluem:

1. Que haja homogeneidade das variâncias dos dados log-transformados em cada tempo de coleta: a variância das concentrações log-transformadas, ao longo dos tempos de colheita, deve ser homogênea. Realiza-se o teste de Bartlett, Hartley ou Cochran;
2. Linearidade dos dados log-transformados ao longo do

tempo, que pode ser verificada por meio da inspeção visual; e 3. Distribuição normal dos erros, para o qual se aplica o teste de Shapiro-Wilk. São considerados valores outliers, aqueles que apresentam resíduo com quatro desvios-padrão fora da linha de regressão. Se não houver normalidade nos erros, deve-se retirar o outlier para obtenção da normalidade. (EMA, 2021).

Portanto, embora a literatura indique que para os estudos de depleção de um resíduo marcador em bovinos, o número de animais para tal seria a partir de quatro, e a quantidade de coletas (datas de coletas) a partir de três, segundo a EMA (2021), ou quatro, segundo o guia proposto pelo guia VICH GL48 (2015), os resultados obtidos no presente estudo não sustentam essa proposta; haja vista que, como apontado, o emprego de cinco animais no presente estudo, comprometeu sobremaneira a realização da análise estatística, bem como não permitiu a obtenção dos dados para o período de carência de vários tecidos aqui analisados.

De fato, à análise do estudo desenvolvido por Brossi (2018), avaliando os níveis IVM em vários tecidos de bovinos da subespécie Nelore, quando foram empregados no mínimo o dobro de animais do que o aqui utilizado, mostra uma homogeneidade de dados bem superior àquela verificada neste estudo. Por exemplo, ao analisar os níveis de IVM em bovinos da subespécie Nelore 35 dias após receberem a avermectina, observa-se uma discrepância significativa nos resultados entre os dois estudos. Assim, na pesquisa anterior, realizada por Brossi (2018), a concentração de 22,23 Dihidroavermectina-B_{1a} no tecido hepático foi de $5 \pm 0,112 \mu\text{g kg}^{-1}$ e no sítio de aplicação $13,17 \pm 0,488 \mu\text{g kg}^{-1}$. Em contraste, a mesma análise no presente estudo, considerando as mesmas matrizes, subespécie, período e o produto (Ivomec[®]), revelou uma concentração de $32,7 \pm 9,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o fígado e $650,5 \pm 609,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ no sítio de aplicação, respectivamente, valores muitas vezes maiores aos reportados anteriormente. Além disso, a grande variação indicada pelo alto valor do erro padrão neste estudo sugere uma heterogeneidade considerável nos dados coletados.

Embora a preocupação com a segurança alimentar humana esteja aumentando em relação à presença de resíduos de medicamentos nos

músculos, que podem permanecer no local da injeção após a aplicação de formulações injetáveis, existem poucas publicações que abordam esse tema. Além disso, na literatura vigente, verifica-se que a interpretação dos dados é frequentemente dificultada por uma série de variáveis (REEVES, 2007).

Por outro lado, já está muito bem estabelecido que as formulações injetáveis podem exibir cinética de depleção nos locais de injeção significativamente mais lenta e mais errática do que em outros tecidos comestíveis, particularmente ao considerar medicamentos com características lipofílicas, como é o caso da IVM, que pode levar a um aumento no tempo de carência (NOUWS et al., 1990). Corroborar essa assertiva um estudo realizado por Brossi (2018), também em bovinos, o qual evidenciou que a concentração de resíduos de IVM no local de aplicação foi consistentemente mais alta do que as concentrações em outros músculos remotos ou tecidos comestíveis, em todos os diferentes dias avaliados (a saber: 8, 15, 35, 49, 120 e 154 dias após a administração de IVM), tanto para a concentração de IVM 1% como de IVM 3,15%. Ressalte-se que o estudo mencionado, também revelou que os níveis desta LM no sítio de aplicação foram ainda maiores do que os níveis hepáticos, onde, sabidamente, apresenta, de maneira geral, maiores valores de resíduos de medicamentos e/ou seus metabólitos (DOYLE, 2006). Sanquer et al. (2006), atentos a essa diferença, propuseram que o cálculo do período de carência no local da injeção não poderia ser definido da mesma maneira que para os tecidos comestíveis padrão, como músculo, gordura, fígado e rim.

Ainda, em relação ao sítio de aplicação, deve-se considerar que, muitas vezes, a detecção do resíduo marcador nas matrizes convencionais (isto é, fígado, rins, músculo e gordura), o qual serve de base para a determinação do LMR, pode muitas vezes não ser a molécula parental e sim seu(s) metabólito(s); portanto este marcador e a razão resíduo marcador/resíduos totais não são automaticamente preditivos para os resíduos no local da injeção, haja vista que é provável que não seja o metabólito presente no local da injeção e, sim, a molécula parental. Desta maneira, se o músculo no sítio da aplicação não estiver representado, o período de carência, considerando-se a abordagem do LMR

isoladamente, pode ser muito pequeno, para garantir que os resíduos no local da injeção tenham níveis adequados (EMA, 2021).

O guia do VICH (2015), bem como a agência EMA (2021) estabelecem que para a obtenção de amostra de músculo, em bovinos, no ponto de aplicação, quando de uma administração por via SC, é necessário coletar uma quantidade de 500 g de tecido, sendo que as dimensões dessa matriz devem ser de 15 cm de diâmetro por 2,5 cm de profundidade. Ainda, esses guias indicam que seja recolhida uma amostra adicional de, aproximadamente, 300 g \pm 20%, ao redor da primeira coleta. Além disso, para avaliar o potencial de migração de resíduos no local de injeção, esses mesmos guias sugerem adotar três abordagens no que se refere ao tecido ao redor da injeção: 1) Coletar uma amostra elíptica (ou de outra forma adequada) ao longo do trajeto da injeção; 2) Fornecer dados sobre o potencial de migração desses resíduos a partir de estudos de resíduo radiomarcado total (TRR); ou 3) Utilizar um corante em um dos métodos de estudo mencionados para uma avaliação visual do potencial de migração dos resíduos.

Embora as sugestões propostas por ambos os manuais (VICH, 2015; EMA, 2021) procurem gerar dados necessários para estimar a quantidade de resíduo de uma substância, nestas informações não foram especificadas as maneiras pelas quais devem ser realizados estes procedimentos e as explicações do porquê das recomendações, tanto no que se refere à quantidade, bem como das dimensões do tecido a ser coletado.

Assim, na segunda parte desta pesquisa, foi objetivo procurar melhor estabelecer a distribuição do medicamento no ponto de aplicação (músculo trapézio), no decorrer do período até o abate, determinado pelo período de carência da IVM 1%, que conforme indicado pelo fabricante é de 35 dias após a última administração do medicamento (IVOMEC, 2023).

Com esse propósito, neste experimento inicialmente procurou-se estabelecer o ponto exato de aplicação do medicamento no animal, empregando-se para tal a tinta nanquim, uma suspensão de partículas de negro

de fumo em um meio (como etilenoglicol) e é comumente usada em canetas para escrever, desenhar ou tatuagem epidérmica. Essa tinta tem uma longa história de uso clínico como marcador anatômico para cirurgia e radioterapia (KHAN et al., 2015), e em outros procedimentos médicos, como a colonoscopia, onde marca pequenas e múltiplas lesões da mucosa como recurso pré-operatório, ou em mastectomias, quando é utilizado para coloração das margens cirúrgicas e da orientação do tecido (KOSEMEHMETOGLU et al., 2010). Portanto, esse corante serviu para marcar o local de aplicação da IVM, uma estratégia essencial para evitar a perda de referência desse local, especialmente em animais zebuínos, haja vista que bovinos de origem indiana possuem uma pele mais solta e flexível em comparação com o gado europeu (DOWLING, 1964), o que torna essa marcação crucial para identificar os pontos de aplicação do medicamento mesmo após o processo de esfolagem no abate. Assim sendo, neste experimento foi usada a subespécie Nelore como o desafio maior para testar a marcação por este corante. Os resultados mostraram que a metodologia se mostrou eficaz, permitindo a identificação precisa do local de administração da IVM 35 dias antes do abate, em todos os animais avaliados. Com essa referência clara, foi possível coletar de forma correta a quantidade de músculo necessária para quantificar a avermectina.

Com a definição do ponto de aplicação, a outra parte do estudo teve como objetivo verificar o “percurso” da IVM desde o dia de sua aplicação até o dia do abate. Com esse intuito, empregou-se um segundo corante, o cristal de violeta, um corante básico, ao qual a membrana celular é permeável e que pode ainda se ligar às substâncias poliméricas extracelulares (WILSON et al., 2017). Os dados aqui obtidos, mostraram que embora o corante tenha se espalhado por um raio não superior a 15 cm de diâmetro, a infiltração do cristal de violeta se aprofundou, se concentrando numa área além dos 2,5 cm de extensão (veja figura 19).

Em vista disso, futuros estudos serão conduzidos, mantendo-se na coleta do músculo do local de aplicação, o diâmetro proposto pelos guias, mas alterando a profundidade, para, pelo menos o dobro (ou seja, no mínimo 5cm de espessura) do que hoje é recomendado. Outra proposta oriunda dos resultados

deste experimento é a de que em cada produto com indicação de administração por via SC ou IM, seja adicionado um corante, pois esse procedimento auxiliará na verificação do resíduo do fármaco no ponto de aplicação. Além disso, estudos já estão em andamento, procurando-se verificar se os corantes aqui empregados (nanquim e cristal de violeta), não interferem com a biodisponibilidade da IVM.

Concluindo, este estudo sugere a possibilidade de diferenças inter-subespecíficas nos níveis de resíduos de IVM em diferentes tecidos. Contudo, as variações consideravelmente significantes nos valores observados em todas as subespécies e amostras, abrangendo diferentes tecidos e períodos de coleta, impediram comparações eficazes e a obtenção de conclusões definitivas. Isso indica que o número de quatro (ou mesmo cinco, como o aqui obtido) amostras por grupo, conforme recomendado por diretrizes internacionais para matrizes oriundas de bovinos, pode ser insuficiente para uma avaliação estatística precisa.

Este estudo também apontou a necessidade de ajustes nos guias internacionais para a coleta de amostras de músculo no local de aplicação, particularmente no contexto da administração SC de IVM. Estudos adicionais estão em andamento para refinar e aprimorar o protocolo proposto para esse procedimento.

6. CONCLUSÃO

Devido às grandes variações obtidas nos resultados das análises dos sete tecidos estudados nas três subespécies e nos quatro períodos de aplicação, não foi possível comparar de forma eficaz as possíveis diferenças na concentração de resíduos de IVM entre as subespécies. Os achados deste experimento indicam concentrações mais elevadas em alguns dos tecidos nos bovinos do grupo *Hereford*, porém não foi conclusivo se estes achados poderiam ter sido influenciados pelo fator subespécie, sugerindo a necessidade de um número maior de animais nos estudos para garantir uma estatística precisa.

De forma geral, nota-se uma diminuição dos valores dos resíduos de IVM ao longo do tempo nas três subespécies. Porém, não foi possível identificar diferenças entre os padrões de depleção de resíduos de IVM ao longo do tempo entre as três subespécies.

Os achados deste experimento refletem padrões distintos de distribuição de resíduos em cada tecido avaliado. Apesar dos resíduos de IVM estarem abaixo dos LMRs estipulados pelo *Codex Alimentarius* em seis dos sete tecidos, os valores encontrados no sítio de aplicação extrapolaram os 30 µg/kg para músculo em todos os tempos do grupo *Hereford*, no tempo 35 dos bovinos Nelore e no tempo 21 dos animais do grupo Angus-Nelore. Estes achados indicam a importância em se ter um protocolo adequado de coleta do sítio de aplicação e, ainda, a importância em se considerar o tempo de depleção de resíduos no sítio de aplicação (até abaixo do LMR) para a determinação do período de carência dos medicamentos.

REFERÊNCIAS

ABIEC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. **Beef Report 2022: perfil da pecuária no Brasil 2022**. ABIEC, 2022. 72p. Disponível em <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2022/> Acesso em 14/10/2023.

ACNB – ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL. **Histórico**. ACNB, 2023. Disponível em: <http://www.nelore.org.br/raca/historico>. Acesso em 08.11.2023.

BASSINI, M. F.; ALVINERIE, M.; LESPINE, A. Macrocyclic lactones: distribution in plasma lipoproteins of several animal species including humans. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology**. New York, v. 138, p. 437-444, 2004.

BATIHA, G.E.S. et al. Avermectin Derivatives, Pharmacokinetics, Therapeutic and Toxic Dosages, Mechanism of Action, and Their Biological Effects. Basel, **Pharmaceuticals**, n. 13, p.196. 2020.

BNDES. BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Exportações de Carne Bovina: Desempenho e Perspectivas**, 2001. Disponível em https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/2964/2/BS%2014%20Exporta%C3%A7%C3%B5es%20de%20carne%20bovina_desempenho%20e%20perspectivas_P.pdf. Acesso em 23/08/20.

BOOBIS, A., et al. Characterizing chronic and acute health risks of residues of veterinary drugs in food: latest methodological developments by the joint FAO/WHO expert committee on food additives. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 47, n.10, p. 889-903, 2017.

BRABANDER, H. et al. Detection of macrocyclic lactones in porcine liver, meat and fish tissue using LC-APCI-MS-MS. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 26, n. 9, p.1232-1238, 2009.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n. 27**, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós registro de medicamentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 22 de maio de 2012.

BROSSI, C. **Distribuição de resíduos de ivermectina e eprinomectina em diferentes tecidos bovinos e em produtos cárneos enlatados termicamente processados.** 17 de maio de 2018. Tese (Doutorado em ciências do programa de pós-graduação em zootecnia) – FZEA/USP, Pirassununga, 2018.

BURG, R. W. et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 15, n.3, p. 361-367, 1979.

CAMPBELL, W.C. (Ed.) **Ivermectin and Abamectin.** New York: Springer Verlag, 1989. 363p.

CANGA, A.G. et al. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. **The Veterinary Journal**, v.179, n. 1, p. 25-37, 2009.

CANTÓN, L., LANUSSE, C., MORENO, L. Rational Pharmacotherapy in Infectious Diseases: Issues Related to Drug Residues in Edible Animal Tissues. Basel, **Animals**, v. 11, 2878, 2021.
<https://doi.org/10.3390/ani11102878>

CANTÓN, L., LANUSSE, C., MORENO, L. Veterinary drug residues in meat-related edible tissues. In: **New Aspects of Meat Quality** (Second Edition). From Genes to Ethics: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Cap. 27, p. 755-783, 2022.

CZERNIAK, R. Gender-based differences in pharmacokinetics in laboratory animal models. **International Journal of Toxicology**. v. 20, n.3, 2001.
<https://doi.org/10.1080/109158101317097746>

CHIU, S. H. L. et al. Metabolic disposition of ivermectin in tissues of cattle, sheep, and rats. **Drug Metabolism and Disposition**. Baltimore, v. 14, n.5, p. 590-600, 1986.

CHIU, S. H. L. et al. Comparative metabolic disposition of ivermectin in fat tissues of cattle, sheep, and rats. **Drug Metabolism and Disposition**. Baltimore, v. 16, n.5, p. 728-736, 1988.

CHIU, S. H. L. et al. Absorption, tissue distribution, and excretion of tritium-labeled ivermectin in cattle, sheep, and rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton, v. 38, n. 11, p. 2072–2078, 1990.

CODEX ALIMENTARIUS. **Section I. Basic Texts and Definitions**, 2021. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/>. Acesso em 14.11.2023.

CORDEIRO, BAB; KINDLEIN, G.; SCHAPER, L.C. Registro de produtos de uso veterinário. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (ed.). **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023.

CRAVEN, J. et al. Pharmacokinetics of moxidectin and ivermectin following intravenous injection in pigs with different body compositions. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford v. 24, p. 99-104, 2001.

DAMTE, D, et al, Evaluation of linear regression statistical approaches for withdrawal time estimation of veterinary drugs, **Food and Chemical Toxicology**. v 50, n. 3-4, p. 773–778, 2011.

DANAHER, M. et al. Recent developments in the analysis of avermectin and milbemycin residues in food safety and the environment. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Hilversum, v. 13, p. 936-951, 2012.

DANAHER, M. et al. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 844, n. 2, p.175-203, 2006.

DONG, L; ZHANG, J. Research progress of avermectin: A minireview based on the structural derivatization of avermectin. **Advanced Agrochem**, v.1, n.2, p.100–112, 2022.

DOWLING, D. F. The significance of the thickness of cattle skin. **The Journal of Agricultural Science**. V. 62, n.3, p. 307-311, 1964.

DOYLE, M. E. Veterinary Drug Residues in Processed Meats: Potential Health Risk. A Review of the Scientific Literature. **Food Research Institute**, University of Wisconsin, Madison, 2006. Disponível em: https://fri.wisc.edu/files/Briefs_File/FRIBrief_VetDrgRes.pdf.

EMA – EUROPEAN MEDICINES AGENCY. (CVMP - Committee for Medicinal Products for Veterinary Use). **Guideline on determination of withdrawal periods for edible tissues**, EMA/CVMP/SWP//2012 Rev,2, Out, 2021.

FAO/WHO. **Codex Alimentarius commission procedural manual**. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations, Codex Alimentarius Commission, 18 ed., 2008. Disponível em: <https://www.fao.org/3/i0505e/i0505e00.pdf>. Acesso em 11 de dezembro de 2023

FAO/WHO. **Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs**. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 81st meeting 2015. FAO JECFA Monographs 18. Disponível em: <https://www.fao.org/3/i5590e/i5590e.pdf>. Acesso em 11 de dezembro de 2023

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry, General Principles for Evaluating the Human Food Safety of New Animal Drugs Used in Food-Producing Animals**. 2018 In: <https://www.fda.gov/media/70028/download>

FINK, D.; PORRAS, A. Pharmacokinetics of ivermectin in animals and humans. In: Campbell, W. **Ivermectin and Abamectin**. New York, USA, Springer-Verlag, p. 90–113, 1989.

GASPAROTTO, O.C. et al. **Fisiologia Animal Comparada**, EaD UFSC, Florianópolis: BIOLOGIA/EAD/UFSC, 2011. 238p. Disponível em: <https://antigo.uab.ufsc.br/biologia//files/2020/08/Fisiologia-Animal-Comparada.pdf>

GAYRARD, V.; ALVINERIE, M.; TOUTAIN, P. L. Comparison of pharmacokinetic profiles of doramectin and ivermectin pour-on formulations in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 47-55, 1999.

GEORGE, M.; HEINRICH, P.; DEXTER, D. Injection-site lesions in carcasses of cattle receiving injections at branding and at weaning. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 11, p. 3235-3240, 1995.

GOTARDO, A. T. et al. The effect of breed, sex, and drug concentration on the pharmacokinetic profile of ivermectin in cattle. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 1-8, 2020.

GRISI, L., LEITE, R. C., MARTINS, J. R. D. S., BARROS, A. T. M. D., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P. H. D., LEÓN, A.A.P; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

HENNESSY, D. R.; ALVINERIE, M. R. **Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy**. Oxon, UK: CABI Publishing, 2002. 116 p.

HOUSHAYMI et al. Oleic acid increases uptake and decreases the P-gp-mediated efflux of the veterinary anthelmintic Ivermectin. **Drug Research**. Stuttgart/New York, Georg Thieme Verlag, v.69, n.3, p. 173-180, 2018.

IVOMEC. Fazenda São Francisco – Paulínia/SP: Boehringer Ingelheim. Resp. Técn.: Simone B. Zampieri. Disponível em: https://www.ivomec.com.br/storage/produtos/ivomec_injetavel_bula.pdf. Acesso em 14.11.23.

KHAN, N. et al. Direct and Repeated Measurement of Heart and Brain Oxygenation Using In Vivo EPR Oximetry. In: **Methods in Enzymology**, Vol. 564, cap. 9, p. 529-552, 2015.

KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, p. 336-345, 2001.

KOSEMEHMETOGLU, K.; GUNER, G.; ATES, D. Indian ink vs tissue marking dye: a quantitative comparison of two widely used macroscopical staining tool. **Virchows Archiv**: Ankara, Turkey, v. 457, p. 21–25, 2010.

KUKANICH, B. et al. Effect of formulation and route of administration on tissue residues and withdrawal times. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 227, n. 10, 2005.

LAFFONT, C. M. **Factors Affecting the Disposition of Ivermectin in the Target Species**. Proefschrift Universiteit Utrecht, 2002. 159p.

LANUSSE, C. et al. Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 20, n.2, p. 91-99, 1997.

LARA, D.M. Residuos químicos en alimentos de origen animal: problemas y desafíos para la inocuidad alimentaria en Colombia. **Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 9, n.1, p. 124-135, 2008.

LEÓN, E.A.; SIGNORINI, M. **Manual de análisis de riesgo** - Aplicado a la sanidad animal y la inocuidad de los alimentos. Fundación Prosaia, 2020. 160p.

LESPINE A. Lipid-like properties and pharmacology of the anthelmintic macrocyclic lactones. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v.9, n.12, 2013.

LESPINE A, et al. Interaction of macrocyclic lactones with the multidrug transporters: The bases of the pharmacokinetics of lipid-like drugs. **Current Drug Metabolism**, v. 10, p. 272-288, 2009.

LIFSCHITZ, A.; MURNO, G.; PIS, A.; SALLOVITZ, J.; VIRKEL, G.; LANUSSE, C. Malnutrition modifies the disposition kinetics of ivermectin in calves. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, p. 71-72, 1997.

LIFSCHITZ, A. et al. Ivermectin distribution kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil-based formulation to cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 86, n.3, p.203-215, 1999.

LIFSCHITZ, A. et al. Comparative distribution of ivermectin and doramectin to parasitic location tissues in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 87, n. 4, p. 327-338, 2000.

LO, P.K.A.; FINK, D.W.; WILLIAMS, J.B.; BLODINGER, J. Pharmacokinetic studies of ivermectin: effects of formulation. **Veterinary Research Communications**, v. 9, p. 251-258, 1985.

LOPES, W. D. Z.; OLIVEIRA, G.P.; COSTA, A.J. Anti-helmínticos utilizados em Medicina Veterinária. In: SPINOSA, H. S.; PALERMO-NETO, J.; GÓRNIK, S. L. **Medicamentos em animais de produção**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2014. 504 p.

LOUSANA, G.; LIMA, T. S. Estudos de segurança nas espécies-alvo. In: SPINOSA, H. S.; PALERMO-NETO, J.; GÓRNIK, S. L. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. p. 75-81, 2. Ed., Manole, São Paulo, 2020.

MANN, C. et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Skeletal Muscle**, London, v. 1, n. 1, p. 21, 2011.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. **Manual de garantia da qualidade analítica. Resíduos e Contaminantes em alimentos**. Brasília: MAPA/ACS, 2011. 227p.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. **Painéis de BI** (Business Intelligence), 2023. Disponível em: <https://mapa-indicadores.agricultura.gov.br/publico/single/?appid=a3e9ce67-d63b-43ff-a295-20123996ead7&sheet=4c2ec12f-be27-47f2-8136-e2fd18cbb54a&lang=pt-BR&opt=ctxmenu&select=clearall> (Acesso em 08.11.2023)

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

MCKELLAR, Q.A.; GOKBULUT, C. Pharmacokinetic Features of the Antiparasitic Macrocyclic Lactones. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.13, p.888-911, 2012.

MEIBOHM, B.; BEIERLE, I.; DERENDORF, H. How important are gender differences in pharmacokinetics? **Clinical Pharmacokinetics**, v. 41, n.5, p. 329-342, 2002.

MORENO, L., CEBALLOS, L., LIFSCHITZ, A., BISTOLETTI, M., ÁLVAREZ, L., LANUSSE, C. Combined subcutaneous administration of ivermectina and nitroxynil in lambs: body weight related changes to kinetic disposition of both compounds. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 2, p. 315-320, 2009.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. 7th. rev.ed. Washington, D.C.: NRC, 2001.

PALATINI, P.; DE MARTIN, S. Pharmacokinetic drug interactions in liver disease: An update. **World Journal of Gastroenterology**, v.22, n. 3, p.1260-1278, 2016.

PALERMO-NETO, J.; RIGHI, D. A. Avaliação de risco: Resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal In: SPINOSA, H.S.; PALEMO-NETO, J.; GÓRNIAC, S. L. **Medicamentos em Animais de Produção**. 1ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2014.

PALERMO-NETO, J; GORNIAC, S. L. Análises de Risco de Resíduos de Produtos Veterinários. In: SPINOSA, H. S.; PALERMO-NETO, J.; GÓRNIAC, S. L. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. p. 506-517, 2. Ed., Manole, São Paulo, 2020.

PALERMO-NETO, J. Considerações gerais sobre o uso de agentes que aumentam a produção animal. In: SPINOSA, H., GÓRNIAC, S., BERNARDI, M. M. (eds). **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023.

PAREDES, R.G; AGMO, A. GABA and behavior: The role of receptor subtypes. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.16, p. 145-170, 1992.

PEDRÃO, M. R. et al. Comparison of proximate chemical composition and texture of cupim, *Rhomboideus* m. and lombo, *Longissimus dorsi* m. of Nelore (*Bos indicus*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 3, p. 715–720, 2009.

REUSS, R. Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues. In: **FOOD Seventy-Eighth Meeting of the Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives**. Annex 3ePilot of New Approaches to Estimate Dietary Exposure to Veterinary Drug Residues. Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs, vol 175, 2014.

REEVES, P. T. Residues of veterinary drugs at injection sites. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. Oxford, v.30, n.1, p.1-17, 2007.

ROMERO-GONZÁLEZ, R., GARRIDO, F., VIDAL, J. L. M. Veterinary drugs residues: anthelmintics. In: MOTARJEMI, Y. (Ed.). **Encyclopedia of Food Safety: Foods, Materials, Technologies and Risks**, v. 3, p. 45-54, 2014.

RÜBENSAM, G.; BARRETO, F.; HOFF, R. B.; KIST, T. B. L.; PIZZOLATO, T. M. A liquideliquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 705, n. 1-2, p. 24 - 29, 2011.

RÜBENSAM, G.; BARRETO, F.; HOFF, R. B.; PIZZOLATO, T. M. Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature cleanup. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 55-60, 2013.

SANQUER, A.; WACKOWIEZ, G.; HAVRILECK, B. Qualitative assessment of human exposure to consumption of injection site residues. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 29, p. 345-353, 2006

SANTARÉM, A. V., AYRES, M.C.C., AMARANTE, A. F. T., LAMBERT, S. M. Agentes Antinematódeos. In: SPINOSA, H., GÓRNIK, S., BERNARDI, M. M. (eds). **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**, Cap. 47, 2023. 643p.

SIVILOTTI, L.; NISTRÍ, A. GABA Receptor mechanism in the central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 36, n.1, p. 35-92, 1991.

SINDAN – SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL, **Indústria Veterinária 2022**. Disponível em https://sindan.org.br/wp-content/uploads/2023/10/Fechamento-Mercado-2022_div-1.pdf. Acesso em: 10 de novembro 2023.

SOUZA, V.F., SOARES, C.O., FERREIRA, S.F. Vacinação, a importância das boas práticas e a prevenção de doenças de interesse em bovinocultura. Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, **Comunicado Técnico**, n. 122, 2009.

TREPANIÉ, L. A. Applying pharmacokinetics to veterinary clinical practice. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 43, n. 5, p.1013-1026, 2013

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. Tokyo, Japan International Cooperation Agency, 4. ed, 1998. 143p.

VAN DONKERSGOED, J. et al. The effect of animal health products on the formation of injection site lesions in subprimals of experimentally injected beef calves. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 41, n. 8, p. 617-622, 2000.

VERBEKE, W. et al. Why consumers behave as they do with respect to food safety and risk information. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, n.1-2, pg. 2-7, 2007.

VERCRUYSSSE, J.; REW, R. S. **Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy**. New York, CABI Publishing, 2002. 432p.

VERCRUYSSSE, D., DEPREZ, P., EVERAERT, D., BASSISSI, F. ALVINERIE, M. Breed differences in the pharmacokinetics of ivermectin administered subcutaneously to Holstein and Belgian Blue calves. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 1-2, p. 136–140, 2008.

VICH (2015): **Guideline GL-48**: Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: marker residue depletion studies to establish product withdrawal periods. EMA/CVMP/VICH/463199/2009.

WHO, 2009a. World Health Organization. Environmental Health. **Criteria 240: Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food**. A Joint Publication of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. Chapter 3: Chemical characterization, analytical methods and the development of specifications, 2009.

WHO, 2009b. World Health Organization. Environmental Health. **Criteria 240: Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food**. A Joint Publication of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. Summary, 2009.

WHO, 2009c. World Health Organization. Environmental Health. **Criteria 240: Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food**. A Joint Publication of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. Chapter 2 - Risk Assessment and its Role in Risk Analysis. Geneva, 2009.

WHO, 2009d. World Health Organization. Environmental Health. **Criteria 240: Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in**

Food. A Joint Publication of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. Chapter 1 e Introduction, 2009.

WHO, 2009e. World Health Organization. Environmental Health. **Criteria 240: Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food.** A Joint Publication of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. Chapter 4 - Hazard Identification and Characterization: Toxicological and Human Studies, 2009.

WHO, 2009f. World Health Organization. Environmental Health. **Criteria 240: Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food.** A Joint Publication of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. Chapter 7 - Risk Characterization, 2009.

WHO, 2020. World Health Organization. Environmental Health. **Criteria 240: Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food.** A Joint Publication of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. Chapter 6 - Dietary Exposure Assessment for Chemicals in Food, 2. ed., 2020.

WILKINSON, P. K.; POPE, D. G.; BAYLIS, F. P. Pharmacokinetics of ivermectin administered intravenously to cattle. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 74, n. 10, p. 1105-1107, 1985.

WILSON, C. et al. Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth: A minireview. Research & Reviews. **Journal of Engineering and Technology**, v. 6, n.4, 2017.

WOODWARD, K.N. Assessment of user safety, exposure and risk to veterinary medicinal products in the European Union. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 50, n.1, p. 114 -128, 2008.