UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAMILA BROSSI

**Distribuição de resíduos de ivermectina e eprinomectina em diferentes tecidos bovinos e
em produtos cárneos enlatados termicamente processados**

Pirassununga

2018

CAMILA BROSSI

Distribuição de resíduos de ivermectina e eprinomectina em diferentes tecidos bovinos e produtos cárneos enlatados termicamente processados

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Júlio César de Carvalho Balieiro

Pirassununga

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Brossi, Camila
B874d Distribuição de resíduos de ivermectina e
eprinomectina em diferentes tecidos bovinos e em
produtos cárneos enlatados termicamente processados
/ Camila Brossi ; orientador Júlio César de Carvalho
Balieiro. -- Pirassununga, 2018.
82 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Carnes e derivados. 2. Antiparasitários. 3.
Resíduos. 4. Comércio internacional. 5. Bovinos de
corte. I. Balieiro, Júlio César de Carvalho, orient.
II. Título.

CAMILA BROSSI

Distribuição de resíduos de ivermectina e eprinomectina em diferentes tecidos bovinos e em produtos cárneos enlatados termicamente processados

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Data da aprovação: 17/05/2018

Banca examinadora:

1º Examinador – Presidente da Banca examinadora

Prof. Dr. Júlio César de Carvalho Balieiro – Orientador

Universidade de São Paulo (USP)

2º Examinador

Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

3º Examinador

Prof. Dr. Sérgio Bertelli Pflanzner Junior

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

4º Examinador

Prof. Dr. Guilherme Sicca Lopes Sampaio

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

4º Examinador

Prof(a). Dr(a). Alessandra Fernandes Rosa

Universidade de São Paulo (USP)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maria Elisa Polletto Brossi e Marcos Brossi, por todo amor;

Ao Fernando Logar Seraphico Peixoto da Silva, pelo companheirismo;

Á minha avó Rosa Malliggieri Polletto por todo seu afeto;

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Julio César de Carvalho Balieiro pela orientação, confiança e paciência.

Ao Bassem Sami Akl Akl, pela oportunidade e incentivo.

Aos colegas Alessandra Fernandes Rosa, Mirele Daiana Poleti, Minus Esperândio Carvalho, pelo apoio.

À JBS S/A pela concessão dos recursos para o desenvolvimento da pesquisa.

Às equipes do laboratório e de pesquisa e desenvolvimento da JBS - Lins pelo suporte.

Ao laboratório de análises Eurofins pela realização dos ensaios.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

RESUMO

BROSSI, C. **Distribuição de resíduos de ivermectina e eprinomectina em diferentes tecidos bovinos e em produtos cárneos enlatados termicamente processados**. 2018. 82 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Um total de 168 machos *Bos indicus* foram abatidos depois de 8, 15, 35, 49, 63, 91, 120 e 154 dias após a aplicação de eprinomectina e ivermectina (convencional e longa ação), e 18 diferentes tecidos comestíveis foram avaliados quanto à concentração de resíduos dessas moléculas para verificar se o período de carência estabelecido garante o esgotamento em todos eles, em níveis abaixo dos limites máximos estabelecidos por agências reguladoras internacionais, com o objetivo de abordar questões relacionadas à barreiras técnico-comerciais entre países. Além disso, visou analisar se a concentração desses resíduos é afetada pelo processamento térmico, para avaliar a coerência de se considerar para produtos enlatados, os mesmos limites determinados para produtos crus. As análises de concentração de resíduos foram feitas por HPLC (sistema LC-MS/MS). Os dados foram transformados para escala “logaritmo natural” e foi realizada análise de variância, teste de comparação múltipla, análises de regressão e de correlação. Os resultados demonstraram que os níveis de eprinomectina encontrados foram abaixo de todos os limites máximos de resíduos (LMR), ao longo de todos os períodos e tecidos avaliados. Com relação à ivermectina, padrões diferenciados de distribuição foram observados, porém ao final do período de carência, dos 18 tecidos avaliados, 17 apresentaram concentrações dentro dos LMR, com exceção do sítio de aplicação, em que se observou alto nível de dispersão e valores acima de alguns LMR, mesmo após cumprido o período de carência indicado na bula. Foram observadas correlações significativas ($P < 0,01$) entre concentrações residuais em fígado e em tecidos musculares, sendo que as equações obtidas podem ser úteis em programas de vigilância. O processamento térmico afetou os resultados de concentração de resíduos de ivermectina em alguns músculos testados, que apresentaram concentração significativamente mais elevada ($P < 0,05$) após a esterilização. Conclui-se que a eprinomectina é mais recomendada que a ivermectina, no que tange ao propósito de se evitar violações de LMR; que foram distintos os padrões de distribuição de resíduos em cada tecido avaliado, mas que se respeitado o período de carência, praticamente todos os tecidos estarão abaixo dos LMR estabelecidos internacionalmente, exceto pelo sítio de aplicação; portanto, que o tempo de depleção de resíduos do sítio de aplicação (até abaixo dos LMR) deveria ser considerado para a determinação do período de carência dos medicamentos; e que é fundamental haver uma harmonização dos LMR em esfera global. Além disso, observou-se que o processamento térmico a que os enlatados são submetidos provoca níveis discrepantes (mais elevados) de resíduos em relação aos produtos crus e isso deve ser levado em consideração nas análises de vigilância, pois pode gerar incertezas quanto à possibilidade de violação em mercados importadores.

Palavras chave: Antiparasitários. Produtos de origem animal. Medicamentos veterinários. Limite Máximo de Resíduos (LMR). Carne bovina.

ABSTRACT

BROSSI, C. Ivermectin and eprinomectin residues distribution in different bovine tissues and in heat treated canned beef. 2018. 82 p. Thesis (Doctorate degree) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

A total of 168 *Bos indicus* males were slaughtered after 8, 15, 35, 49, 63, 91, 120 and 154 days post-application of eprinomectin and ivermectin (conventional and long-acting), and 18 different edible tissues were evaluated for the residue concentration of these molecules to verify if the established withdrawal period guarantees depletion in all of them, at levels below the maximum limits established by regulatory agencies around the world, in order to address issues related to technical trade barriers between countries. In addition, it aimed to analyze if the concentration of these residues is affected by thermal processing, to evaluate the consistency of considering for canned goods, the same limits determined for raw products. Residue concentration analyzes were performed using HPLC (LC-MS / MS system). Data were converted into "natural logarithm" scale and analysis of variance, multiple comparison test, regression and correlation analysis were performed. Results showed that eprinomectin levels were found to be below all maximum residue limits (MRL) throughout all periods and tissues evaluated. Regarding ivermectin, differentiated distribution patterns were observed, but at the end of the withdraw period, 17 of the 18 tissues evaluated had concentrations within the MRLs, except for the injection site, where a high level of dispersion was observed and values above some of MRLs recommended by the main international regulations, even after having been completed the withdraw period indicated in the instructions. Significant correlations ($P < 0.01$) were observed between residual concentrations in liver and muscle tissues, and the equations obtained may be useful in surveillance programs. The thermal processing affected ivermectin concentration results in some tested muscle types, which had a significantly higher residue concentration ($P < 0.05$) after sterilization. It was concluded that eprinomectin is more recommended than ivermectin for the purpose of avoiding MRL violations; that the residue distribution patterns in each tissue were different, but if the withdrawal period is met, almost all tissues will be below internationally established MRLs except for the application site; therefore, that the depletion time of injection site residues (to below the MRL) should be considered for the determination of the drug withdrawal period; and that harmonization of MRLs is essential in the global sphere. In addition, it has been observed that the thermal processing to which the canned products are subjected causes discrepant (higher) levels of residues in relation to the raw products and this must be taken into account in surveillance analyzes, since it may generate uncertainties as to the possibility of violation in importers markets.

Keywords: Antiparasitics. Animal products. Veterinary drugs. Maximum Residue Limit (MRL). Meat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do processo de extração.....	42
Figura 2 - Concentração de eprinomectina pour on (EPR-PO) em escala transformada (LN_EPR-PO) em fígado, em função dos dias avaliados após a aplicação do princípio ativo (carência). Equação de Predição: $Y=2,9919-0,06771X+0,000806X^2$	53
Figura 3 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em carne de sangria, em função dos dias pós aplicação.....	58
Figura 4 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em coxão duro, em função dos dias pós aplicação.....	58
Figura 5 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em lagarto, em função dos dias pós aplicação.....	59
Figura 6 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em recortes, em função dos dias pós aplicação.....	59
Figura 7 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em contrafilé, em função dos dias pós aplicação.....	59
Figura 8 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em fraldinha, em função dos dias após a aplicação.....	60
Figura 9 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em sítio de aplicação, em função dos dias após a aplicação.....	60
Figura 10 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em lombinho, em função dos dias pós aplicação.....	60
Figura 11 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em miolo do pescoço, em função dos dias pós aplicação.....	61
Figura 12 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em ponta do noix, em função dos dias pós aplicação.....	61
Figura 13 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em tendões, em função dos dias pós aplicação.....	61
Figura 14 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em pescoço, em função dos dias pós aplicação.....	62

Figura 15 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em capa do pescoço, em função dos dias pós aplicação.....	62
Figura 16 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em bucho, em função dos dias pós aplicação.....	62
Figura 17 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em gordura, em função dos dias pós aplicação.....	63
Figura 18 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em língua, em função dos dias pós aplicação.....	63
Figura 19 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em carne de cabeça, em função dos dias pós aplicação.....	63
Figura 20 - Comportamento das concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) nos tecidos musculares (carne de sangria, coxão duro, lagarto, recortes e contrafilé), em função das concentrações do princípio ativo no fígado.....	67
Figura 21 - Comportamento das concentrações de ivermectina longa ação (IVM-LA) nos tecidos musculares (carne de sangria, coxão duro, lagarto, recortes e contrafilé), em função das concentrações do princípio ativo no fígado.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação dos animais de acordo com os tratamentos a que foram submetidos	36
Tabela 2 - Delineamento experimental do projeto, contendo os números de animais tratados e controles para os três grupos testados, os medicamentos e suas carências, a via de administração e os dias de avaliação pós-aplicação	37
Tabela 3 - Períodos planejados e reais de avaliação, pós-aplicação dos medicamentos ivermectina convencional (IVM-CO), eprinomectina pour on (EPR-PO) e ivermectina longa ação (IVM-LA)	38
Tabela 4 - Esquema de distribuição dos abates, em função dos dias pós-administração dos medicamentos	39
Tabela 5 - Níveis de fortificação em amostras brancas para a curva analítica.....	41
Tabela 6 - Número de amostras preparadas para análise da concentração de ivermectina antes e após processo térmico de esterilização.....	43
Tabela 7 - Estatísticas descritivas para a variável concentração (em ppb) de ivermectina e eprinomectina em escala original (IVM-CO, IVM-LA e EPR-PO), para ivermectina convencional, ivermectina longa ação e eprinomectina pour on, em cada tecido avaliado, considerando todos os períodos de carência (pós aplicação do medicamento) testados (continua).....	47
Tabela 8 - Estimativas de médias das concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e de longa ação (IVM-LA) e eprinomectina pour on (EPR-PO) (em ppb), nos tecidos avaliados ao longo dos dias após a aplicação de cada princípio ativo (continua)	50
Tabela 9 – Tempo em dias (em função dos dias avaliados neste experimento) que as concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO), ivermectina longa ação (IVM-LA) e eprinomectina (EPR-PO) levaram para apresentar concentrações inferiores ao limite de quantificação da técnica analítica (<5 ppb) após a aplicação dos medicamentos	55
Tabela 10 - Estimativas dos interceptos (β_0), coeficientes de regressão (β_1 e β_2), respectivas probabilidades associadas às estimativas de β_i , para $i=1$ ou 2 , ponto de mínimo das funções ($X_{min.}$), concentrações estimadas (em escala logarítmica e em escala original) para ivermectina convencional (IVM-CO) ao longo dos períodos pós aplicação, para cada tecido avaliado	57
Tabela 11 - Estimativas dos interceptos (β_0), coeficientes de regressão (β_1 e β_2), respectivas probabilidades associadas às estimativas de β_i , para $i=1$ ou 2 , ponto de mínimo das funções ($X_{min.}$), concentrações estimadas (em escala logarítmica e em escala original) para ivermectina longa ação (IVM-LA) ao longo dos períodos pós aplicação, para cada tecido avaliado	57
Tabela 12 - Estimativas de correlações momento-produto de Pearson para a variável concentração de ivermectina convencional (IVM-CO) e ivermectina longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA)	65
Tabela 13 - Estimativas dos interceptos (β_0), coeficiente de regressão (β_1), valores de probabilidades ($H_0:\beta_1=0$) e coeficientes de determinação (R^2) para concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e ivermectina longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) dos tecidos musculares em função das concentrações do princípio ativo no fígado.....	66

Tabela 14 - Resumo das análises de variância para a variável concentração de ivermectina antes e após o processamento térmico	70
Tabela 15 - Estimativas de médias de concentração de ivermectina (em ppb) dos tecidos carne de cabeça, miolo do pescoço, carne de sangria e tendões para as variáveis antes e após processamento térmico	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Avermectinas	15
2.2 Resíduos de medicamentos veterinários sob a ótica da inocuidade do alimento de origem animal.....	18
2.2.1 Estabelecimento de Limite Máximo de Resíduos (LMR) e períodos de carência.....	21
2.3 Implicações da falta de harmonização dos programas de vigilância de resíduos no comércio internacional de carne.....	25
2.3.1 Violações de LMR de avermectinas em carne brasileira e suas consequentes barreiras técnico-comerciais	25
2.4 Resíduos de avermectinas em produtos enlatados termicamente processados.....	29
2.5 Metodologias utilizadas para análise de resíduos.....	31
3 HIPÓTESES	33
4 OBJETIVOS.....	34
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5.1 Local	35
5.2 Animais.....	35
5.3 Descrição dos grupos experimentais.....	35
5.4 Abate dos animais experimentais e coleta de amostras.....	38
5.5 Análises laboratoriais de resíduos de ivermectina e eprinomectina	40
5.5.1 Reagentes e materiais utilizados	40
5.5.2 Preparo de curva analítica e controles	41
5.5.3 Fluxograma do processo de extração.....	41
5.5.4 Equipamentos utilizados para injeção e detecção de massas.....	42
5.6 Avaliação de produtos cárneos enlatados termicamente processados.....	42
5.7 Análises estatísticas	44
5.7.1 Análises estatísticas dos resultados de depleção de resíduos de ivermectina e eprinomectina em diferentes tecidos	44
5.7.2 Análises estatísticas para obtenção de estimativas de correlação de resíduos de ivermectina entre fígado e músculo	45
5.7.3 Análises estatísticas dos resultados de concentração de resíduos em produtos cárneos enlatados termicamente processados.....	45
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1 Dinâmica de depleção de resíduos de ivermectina e eprinomectina em diferentes tecidos....	47
6.2 Estimativas de correlação de resíduos de ivermectina entre fígado e músculo	64

6.3 Comportamento dos resíduos de ivermectina em produtos cárneos enlatados termicamente processados.....	69
7 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

Como qualquer agente terapêutico administrado a animais destinados à produção de alimentos, resíduos de medicamentos veterinários em seus tecidos biológicos são um assunto de grande preocupação, envolvendo tanto a segurança dos consumidores (ESCRIBANO et al., 2012), quanto estratégias de gestão da indústria processadora de carne, face aos limites estabelecidos pelos diferentes mercados internacionais.

Vermífugos são uma das classes de medicamentos veterinários mais utilizadas em todo o mundo na profilaxia e tratamento de infecções por parasitas, sendo essenciais para a manutenção da saúde animal e viabilidade econômica da produção animal (COOPER et al., 2012), especialmente em sistemas extensivos (BENNEMA et al., 2010), que correspondem a quase 80% da pecuária de corte brasileira (ABIEC, 2017).

Dentre os vermífugos, o grupo das avermectinas, que são lactonas macrocíclicas (LM), é o mais amplamente utilizado em todo o mundo, sendo a ivermectina a mais conhecida e utilizada entre elas devido ao seu amplo espectro de atividade, alta eficiência e elevada margem de segurança. Posteriormente, várias drogas passaram a ser desenvolvidas como alternativa à ivermectina, como por exemplo, a eprinomectina (DANAHER et al., 2012), que surgiu de um esforço para encontrar um membro da classe das avermectinas que pudesse ser usado em todo tipo de gado, em qualquer estágio de produção, com eficácia e segurança, especialmente no que diz respeito à resíduos no leite (SHOOP et al., 1996).

É sabido que parâmetros farmacocinéticos variam bastante de acordo com diferentes fatores que podem influenciar a concentração plasmática dos medicamentos. Fatores tais como via de administração, veículo usado na formulação comercial, espécie animal, conformação, condição corporal, status fisiológico e nutrição criam dificuldades quando se tenta extrapolar resultados de pesquisas entre diferentes tipos de animais (BOGAN; MCKELLAR, 1988; LANUSSE et al., 1997; GAYRARD; ALVINERIE; TOUTAIN, 1999).

Segundo Chiu et al. (1986, 1988, 1990), o padrão de depleção de resíduos de medicamentos em tecidos biológicos pode diferir de acordo com a localização anatômica e/ou função fisiológica, o que deve ser levado em consideração quando forem implementadas estratégias de controle de limites máximos de resíduos (LMR) em indústrias de carne.

Dados requeridos para aprovação de medicamentos veterinários são obtidos de estudos que testam o esgotamento dos resíduos químicos em alguns tecidos alvo, geralmente fígado, gordura, rim e músculo esquelético. Com essas informações, são determinados os períodos de carência dos medicamentos (REEVES, 2007). Em muitos casos, os testes são feitos com raças

de animais mais prevalentes no país do *sponsor* da molécula (laboratório farmacêutico patrocinador do estudo e detentor da patente) e não necessariamente novos testes são requeridos, quando da importação deste produto por outro país, no momento de seu registro junto ao órgão regulamentador. Logo, existe uma lacuna de conhecimento sobre a dinâmica de depleção de medicamentos veterinários em tecidos comestíveis de bovinos diferentes daqueles que foram avaliados nos estudos clínicos de aprovação da molécula.

Sabendo que nem todos os tecidos possuem a mesma dinâmica de depleção de medicamentos veterinários a base de avermectinas (CHIU et al., 1986, 1988, 1990; JIANG et al., 2005), assim como nem todos os tipos de tecidos foram testados nos ensaios clínicos para aprovação de uso dos medicamentos (ivermectina e eprinomectina) (US FDA, 1998; 2014), pode haver tecidos que permanecem com resíduos acima dos LMR estabelecidos pelos órgãos reguladores dos principais mercados, mesmo após o cumprimento do período de carência estabelecido pelos fabricantes dos medicamentos.

O rebanho bovino brasileiro de 219 milhões de cabeças produziu, em 2016, 9,14 milhões de toneladas equivalente carcaça (TEC), com um abate de 36,9 milhões de animais. Das quase 10 milhões de toneladas de carne produzidas, cerca de 20% foi exportada (ABIEC, 2017). A carne bovina enlatada está classificada na categoria de preparações/conservas, que representa 10% do faturamento total da carne exportada pelo Brasil. Em 2017 foram 89 mil toneladas exportadas, um negócio que movimentou US\$ 516 milhões (ABIEC, 2017).

A maior parte das pesquisas sobre resíduos antiparasitários nos alimentos (carne, produtos lácteos, ovos, etc.) está relacionada com as concentrações no produto cru. No entanto, a maioria desses alimentos são cozidos, pasteurizados, processados antes do consumo (IMPERIALE et al., 2009). Em geral, os resíduos de medicamentos veterinários à base de lactonas macrocíclicas são altamente estáveis, no que se refere à degradação da molécula, sob uma variedade de condições de preparo culinário (ROSE; FARRINGTON; SHEARER, 1998), porém pouco se sabe a respeito do comportamento destas moléculas em produtos cárneos enlatados submetidos ao termo processamento em autoclaves industriais.

Em produtos cárneos, o comportamento das moléculas químicas pode sofrer alterações estruturais quando submetidas ao processo de autoclavagem, podendo resultar em variações em relação à concentração no produto cru. Isto dificulta a assertividade da triagem para monitoramento desse tipo de produto pela indústria produtora de alimentos cárneos enlatados, já que podem levar a resultados de concentração de resíduos diferentes do que seria obtido a partir do produto cru, considerando que as análises são sempre realizadas pelos mercados importadores diretamente no produto final que está sendo comercializado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Avermectinas

Em 1979, um grupo de pesquisadores apresentou os resultados de atividade antiparasitária de um produto da fermentação do actinomiceto *Streptomyces avermectilis*, que foi nomeado de *avermectins* (*a*=sem, *ver*m=verme, *ect*=ectoparasitas e *ins*=produtos farmacêuticos). Os extratos dessa substância foram testados e apresentaram resultados sugerindo alta atividade contra a proliferação de ecto e endoparasitas (BURG et al., 1979).

Posteriormente, um número de drogas foi desenvolvido como alternativa para ivermectina, incluindo abamectina, doramectina e moxidectina, que é uma milbemicina. Mais recentemente, verificou-se o desenvolvimento de drogas para aplicações especializadas, tais como emamectina, para o controle de piolhos do mar em salmão e eprinomectina para o controle de parasitas em gado leiteiro (DANAHER et al., 2012).

As substâncias naturalmente produzidas pelo *S. avermectilis* foram identificadas como A_{1a}, A_{1b}, A_{2a}, A_{2b}, B_{1a}, B_{1b}, B_{2a} e B_{2b}, sendo A_{2a}, B_{1a} e B_{2a}, os principais produtos da fermentação. A avermectina B₁ (genericamente conhecida como abamectina), é a avermectina mais importante produzida naturalmente (DANAHER et al., 2006) e a partir dela são produzidas outras formas de avermectinas. Com a hidrogenação dos carbonos C-22 e C-23 da abamectina obtêm-se a ivermectina, que possui excelente atividade antiparasitária (típica para avermectinas B₁) e toxicidade baixa (típica para as avermectinas B₂) (DANAHER et al., 2006). A eprinomectina é obtida pela adição do grupamento acetilamino no C-4 e a emamectina pela adição do grupamento metilamino no C-4 (SHOOP et al., 1996). A doramectina é produzida pela fermentação do mutante genético *Streptomyces avermectilis bkd* na presença do ácido ciclohexanocarboxílico e apresenta hidrocarboneto ciclohexano no C-25 (CROOP; WILSON; REYNOLDS, 2000).

Genericamente, as massas moleculares de todas as lactonas macrocíclicas (LM) são elevadas (MUSHTAQ et al., 1996). A diferença de lipofilicidade entre as LM é atribuída basicamente aos seus diferentes grupamentos químicos em sítios específicos. A lipofilicidade é uma das propriedades físico-químicas mais importantes deste grupo, pois é o que determina a velocidade de absorção destes compostos pelo organismo. As variações de lipofilicidade entre as LM definem as importantes e significativas alterações de eficácia e atuação entre esses elementos, propiciando maior ou menor disponibilidade no organismo animal (ONG; LIU; PIDGEON, 1996).

Schenck, Barker e Long (1992) relataram que resíduos de ivermectina sofrem depleção muito lentamente no organismo dos animais e isso se deve à sua elevada lipofilicidade. Em contraste, a eprinomectina é uma LM com menor associação à lipídios, o que resulta em uma meia-vida menor e valores mais elevados de concentração máxima ($C_{máx}$), comparativamente com outras LM (ALVINERIE et al., 1999).

Vários pesquisadores demonstraram que a condição corpórea (gordura contra tecido muscular) possui influência sobre a farmacocinética da droga. No caso da ivermectina, meias-vidas mais longas foram observadas em espécies obesas, suínos e ovinos, em comparação com o gado bovino (HENNESSY; ALVINERIE, 2002). Craven et al. (2001) encontraram para suínos que meias-vidas de eliminação mais curtas foram observadas para os animais mais magros.

A ação das avermectinas sobre os endo e ectoparasitas se deve à sua afinidade aos neurotransmissores glutamato de seres invertebrados e ácido γ -aminobutírico (GABA) de alguns invertebrados e vertebrados. De forma geral, baixas concentrações de LM potenciam os efeitos dos neurotransmissores glutamato e GABA, aumentando o fluxo dos íons de cloro na membrana celular. Em altas concentrações de LM, elas mesmas abrem os canais de cloro ligados aos receptores do GABA e do glutamato (KÖHLER, 2001). Além disso, as LM podem promover o bloqueio do bombeamento da faringe, o que leva à morte do parasita por falta de alimentação. Podem ser absorvidas via oral, como no caso de parasitas hematófilos, ou passivamente, como no caso de nematoides gastrointestinais (MCKELLAR; BENCHAOUI; 1996).

O metabolismo das LM, em tecidos de animais, de forma geral, funciona da seguinte maneira: a fração de medicamento absorvida entra no sistema circulatório e permanece em equilíbrio, ora formando um complexo com as lipoproteínas de alta densidade (HDL: *high-density lipoprotein*), junto com os demais solutos lipofílicos como o colesterol, ora sendo absorvida por tecidos presentes durante o transporte. No caso da eprinomectina, ligando-se mais à fração proteica das lipoproteínas de baixa densidade (LPDF: *low-density lipoprotein*). Grande parte desses complexos é levada para o fígado, via transporte reverso do colesterol (BASSINI; ALVINERIE; LESPINE, 2004).

LM podem ser administradas em bovinos por meio de injeção, *pour on* (aplicação tópica) ou por meio de bolus intraruminal (BRABANDER et al., 2009). Existem alguns trabalhos científicos que demonstram que a via de administração afeta parâmetros farmacocinéticos, tais como concentração máxima ($C_{máx}$), tempo de $C_{máx}$ ($T_{máx}$) e meia-vida da droga. A meia-vida da ivermectina em bovinos, após administração pelas vias oral,

subcutânea e tópica é de 2,7; 5,5 e 5,3 dias, respectivamente (WILKINSON; POPE; BAYLIS, 1985; GAYARD; ALVINERIE; TOUTAIN, 1999).

Os principais metabólitos hepáticos da ivermectina são 24 hidroximetilivermectina, 3"-O-desmetil-H2B1 e o componente H2B1b. Entretanto, o principal resíduo encontrado nas fezes, urina, leite, bile e tecidos é o componente H2B1a (FAO/WHO, 1991; ALVINERIE; GALTIER, 1995). Assim, estudos com compostos marcados têm indicado que o componente ivermectina B1a é o resíduo de maior quantidade em todos os tecidos, em até 28 dias após a administração em bovinos. O componente B1b é encontrado em menor quantidade, pois é metabolizado mais rapidamente (WILKINSON; POPE; BAYLIS, 1985).

Danaher et al. (2006) relataram que resíduos de LM são mais persistentes quando a droga é administrada por injeção subcutânea, quando comparada à aplicação *pour on*. Como resultado, períodos de carência mais longos, na faixa de 34-45 dias, são necessários para garantir que os resíduos estejam abaixo dos LMR. Porém, existem ainda preparações de ivermectina de longa ação altamente concentradas a serem administradas em bovinos, com o intuito de prolongar o período de persistência do antiparasitário (LIFSCHITZ et al., 1999, 2000), que apresenta em torno de 122 a 140 dias de período de carência.

Recomenda-se que a administração de formulações injetáveis de ivermectina seja feita na região do pescoço, próximo ao ombro, porém sabe-se que a administração de medicamentos veterinários como os anti-helmínticos pode desenvolver lesões na musculatura adjacente à região de injeção (MANN et al., 2011). Embora a maioria das lesões ocorram com a injeção intramuscular, a administração subcutânea também pode causar algum dano (VAN DONKERSGOED et al., 2000), uma vez que o solvente da formulação ou a precipitação do medicamento pode irritar o tecido local (RASMUSSEN, 1980; REEVES, 2007).

Entre as diferentes preparações disponíveis no mercado farmacêutico veterinário, as formulações injetáveis de liberação contínua (por exemplo, veículos não aquosos, como propileno glicol e vários óleos) irritam os tecidos após a injeção (BAGGOT; BROWN, 1998).

A detecção de concentrações de medicamento residual no local da injeção é muito variável e pode ser causada pela absorção incompleta do volume total administrado. As lesões que diferentes veículos podem produzir no local da injeção podem contribuir para a persistência de uma proporção da dose no sítio de aplicação (GEORGE; HEINRICH; DEXTER, 1995).

2.2 Resíduos de medicamentos veterinários sob a ótica da inocuidade do alimento de origem animal

O consumidor moderno exige confiabilidade em relação à qualidade e segurança dos alimentos, especialmente quando se trata de produtos de origem animal, em que se busca ausência de contaminantes prejudiciais à saúde, incluindo-se os resíduos químicos, que podem ser associados à industrialização ou ligados à produção agrícola, como aqueles que são utilizados para ajudar a garantir a saúde animal, por exemplo, os medicamentos veterinários (SAEGERMAN et al., 2006).

Embora medicamentos veterinários colaborem com a pecuária e com a indústria e comércio relacionados a ela, seu uso indiscriminado ou o não cumprimento das medidas adequadas, como por exemplo, praticar a dose recomendada e obedecer ao período de carência estipulado, propiciam a permanência de resíduos nos tecidos biológicos comestíveis como leite e carne (RUBENSAM, 2010).

Dessa forma, a aplicação de fármacos auxiliares à produção animal exige atenção especial dos órgãos reguladores, que estabelecem limites máximos de resíduos (LMR) para tais compostos em uma variedade de produtos como norma de segurança alimentar, a fim de harmonizar sua comercialização (EUROPEAN UNION, 2005, 2010a).

Os LMR são baseados em avaliações de risco toxicológico para proteger os seres humanos mais sensíveis e ajustados de acordo com limites aceitáveis de exposição alimentar, em concentrações que garantam sua compatibilidade com boas práticas no uso de medicamentos veterinários. Isso deveria garantir que os alimentos obtidos de animais tratados com medicamentos veterinários aprovados, não contenham resíduos, incluindo os locais de injeção (sítios de aplicação), que podem se constituir em risco para a saúde do consumidor.

Dessa forma, os LMR são estabelecidos para cada princípio ativo e os períodos de carência são atribuídos para cada formulação, durante o processo de aprovação do produto (REEVES, 2007).

Segundo Reeves (2007), durante o processo de aprovação de medicamentos veterinários destinados à produção de alimentos é requerido que sejam demonstrados dados de apoio que comprovem a segurança de quaisquer resíduos que possam permanecer nos tecidos e produtos comestíveis (carne, vísceras, leite, ovos) de animais tratados. Esses dados referem-se principalmente à toxicologia e à química de resíduo.

A avaliação de risco examina estudos de toxicidade para caracterizar as propriedades inerentes ao produto químico e estabelecer um NOEL (*non-observed effect level*, ou seja,

nível de efeito não observado) e uma ADI (*acceptable daily intake*, ou seja ingestão diária aceitável). O NOEL é a dose mais alta que não causa nenhum efeito detectável nas espécies mais sensíveis de animais testados. A ADI é a quantidade do respectivo produto químico que pode ser consumido diariamente durante toda a vida, sem causar risco apreciável para a saúde humana. Esta é calculada dividindo-se o NOEL apropriado, por um fator de segurança, que pode variar entre 10 e 2000, mas é geralmente 100 se o NOEL for derivado de um estudo em uma espécie animal de laboratório. O fator de segurança leva em consideração as incertezas inerentes encontradas na extrapolação de dados de toxicidade animal para efeitos potenciais em seres humanos e para variação entre seres humanos. Um fator de segurança de 100, por exemplo, é reconhecido como compreendendo dois fatores de 10 vezes, para permitir que os seres humanos sejam até 10 vezes mais sensíveis do que os animais de teste e uma variação de 10 vezes entre os indivíduos dentro da população humana (RUBERY; BARLOW; STEADMAN, 1990).

Os tecidos-alvo são os tecidos comestíveis selecionados para monitorar o resíduo total no animal-alvo e, geralmente, são considerados os tecidos com as taxas de depleção mais lentas. O resíduo marcador e os tecidos-alvo são selecionados de modo que, quando a concentração do resíduo marcador nos tecidos-alvo estiver abaixo do LMR, os resíduos em todos os tecidos comestíveis padrões (músculo, gordura, fígado e rim) serão inferiores ao respectivo LMR (FAO/WHO, 1993).

A avaliação do risco alimentar foi conceituada de acordo com a seguinte relação: $\text{risco} = \text{perigo} \times \text{exposição}$, em que o "risco" é a probabilidade de ocorrência de danos ao consumidor; "perigo" reflete as propriedades inerentes ao químico; e "exposição" refere-se à exposição dietética ao resíduo químico (DAVIES; O'CONNOR; LOGAN, 2003).

Esta relação mostra que o risco é reduzido quando o perigo e/ou a exposição é reduzida. A avaliação da segurança dos resíduos de pesticidas e de medicamentos veterinários em alimentos humanos considera dados relacionados à toxicologia, metabolismo e resíduos (REEVES, 2005).

A ivermectina é uma droga bem tolerada e, exceto em alguns animais geneticamente modificados (cães da raça collie), não foram detectados efeitos colaterais em mamíferos em doses farmacológicas (FISHER; MROZIK, 1992; MEALEY et al., 2001). Apenas um trabalho evidenciou que a ivermectina é capaz de induzir genotoxicidade e citotoxicidade em células mamíferas expostas *in vitro* (células CHO-K1 – Chinese hamster ovary) (MOLINARI et al., 2009). Por outro lado, foi concluído por diversos grupos de pesquisadores que este antiparasitário não representaria um perigo significativo devido a suas propriedades físico-

químicas (BURG et al., 1979; EGERTON et al., 1979; CHABALA et al., 1980; CAMPBELL et al., 1983; TAKAHASHI et al., 2002; KITA; SHIOMI; OMURA, 2007). Molinari, Soloneski e Larramendy (2010) compilaram resultados de diversos autores e nenhum dos trabalhos demonstrou que ivermectina induziu *in vitro* ou *in vivo* mutações genéticas, tanto em células bacterianas, quanto mamíferas, em nenhuma concentração, com ou sem ativação metabólica. Não há evidência concreta de efeito clastogênico com diferentes concentrações testadas tanto *in vitro* como *in vivo*. Esse medicamento foi negativo em vários bioensaios de genotoxicidade. A baixa toxicidade da ivermectina foi atribuída ao seu acesso restrito a alguns órgãos e tecidos cerebrais, especialmente por ser um substrato de P-glicoproteína (SCHINKEL et al., 1994).

A P-glicoproteína (P-gP) é o produto do gene de multirresistência à fármacos (MDR1) responsável pelo transporte de efluxo de fármacos e xenobióticos. A P-gP foi descoberta em células tumorais multirresistentes a diferentes agentes quimioterápicos. Atualmente, sabe-se que ela não está expressa somente em células tumorais, mas também em tecidos normais e em barreiras hemato-teciduals (HEBERT, 1997; WATKINS, 1997; THIEBAUT et al., 1987) .

A ADI da ivermectina é, atualmente, de 0-10 µg/kg de peso corpóreo por dia, com base em um NOEL de 1,5 mg/kg de peso corpóreo por dia, para efeitos neurológicos (midríase) e retardo em ganho de peso, num estudo de 14 dias com cães. Esta ADI era, anteriormente, de 0-1 µg/kg de peso corpóreo por dia, mas foi revisada com a aplicação de um fator de correção de 50 (sendo 5 para diferenças interespecies baseado em estudos farmacológicos em cães e humanos e 10 para diferenças intraespécie) (FAO/WHO, 2015).

A Dose de Referência Aguda (ARfD: *Acute Reference Dose*) estabelecida para ivermectina é de 0,2 mg/kg de peso corpóreo, com base em um NOEL de 1,5 mg/kg de peso corpóreo, ou seja, é a dose mais alta testada em um estudo de segurança, tolerabilidade e farmacocinética em indivíduos saudáveis, com aplicação de um fator de incerteza de 10 para variabilidade intraspecie (FAO/WHO, 2015). A ARfD indica a quantidade de uma substância presente no alimento e/ou água que pode ser ingerida num período de 24 h ou menos sem que haja apreciável risco para a saúde do consumidor (SOLECKI et al., 2005).

A ingestão diária estimada (EDI: *Estimated Daily Intake*) para ivermectina é de 38 µg/pessoa por dia, com base em um indivíduo de 60 kg, o que representa 6% do limite superior da ADI. A Estimativa Global da Exposição Dietética Crônica (GECDE: *Global Estimated Chronic Dietary Exposure*) para a população em geral é de 0,9 µg/kg de peso corporal por dia, o que representa 9% do limite superior da ADI. O GECDE para crianças é de 1,5 µg/kg de peso corporal por dia, o que representa 15% do limite superior da ADI. O

GECDE para lactentes é de 1,3 µg/kg de peso corporal por dia, o que representa 13% do limite superior da ADI. O EDI é uma estimativa da exposição dietética aos resíduos de medicamentos veterinários a ser usada na avaliação de toxicidade crônica e exposição dietética crônica, com base em uma dieta modelo específica e concentrações medianas de resíduos, ajustadas para o total do marcador. O GECDE é a maior exposição calculada para um único alimento selecionado a partir de todos os alimentos mais a exposição dietética média de todos os outros alimentos relevantes (FAO/WHO, 2015).

A Exposição Dietética Aguda Estimada (GEADE: *Global Estimated Acute Dietary Exposure*) é uma análise combinada de todos os estudos apresentados e mostrou que, após 14 dias, os valores máximos de resíduos de ivermectina encontrados nos locais de injeção levaram a uma GEADE de 52 µg/kg de peso corpóreo para a população geral e 87 µg/kg de peso corpóreo para crianças, correspondendo, a 27% e 43% da ARfD, respectivamente. A GEADE considera a exposição de alto nível de cada alimento relevante de origem animal individualmente, ou seja, ocorrência simultânea de concentração elevada de resíduo em cada alimento ao qual o consumidor pode ser exposto, combinado com um alto consumo diário desse alimento (carne, miúdos, leite, outros) (FAO/WHO, 2015).

2.2.1 Estabelecimento de Limite Máximo de Resíduos (LMR) e períodos de carência

Para o estabelecimento de LMR é necessário que se faça um cálculo da Ingestão Diária Aceitável (ADI) desta substância para os consumidores e, para isso, leva-se em conta o consumo médio alimentar de cada um dos gêneros alimentícios, definidos como "cesta básica", além do comportamento farmacocinético da substância no animal e ainda um possível fator de segurança extra (ESCRIBANO et al., 2012). A regulamentação deste procedimento pode variar de um país para outro, bem como os componentes da "cesta básica", acarretando na existência de diferentes LMR.

Os LMR para avermectinas na União Europeia (UE), Canadá, Austrália, Japão, Estados Unidos da América (EUA), China e os estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* podem ser observados no Quadro 1.

Quadro 1 - Limites máximos de resíduos em bovinos, estabelecidos para Lactonas Macroclínicas Clássicas na União Europeia (UE), Estados Unidos da América (EUA), Canadá, Austrália, China, Japão e os recomendados pelo *Codex Alimentarius*

Substância ativa (Resíduo marcador)	Organização ou país	Gordura	Fígado	Músculo	Rim	Leite
Abamectina (Abamectina B1a)	<i>Codex</i>	100	100	-	50	-
	UE	10	20	-	-	Não permitido ^a
	EUA	50	90	20	90	15
	Canadá	100	50	10	50	-
	Austrália	100	100 ^b	5	-	20
	China	100	100	-	50	Não permitido ^a
	Japão	100	100	10	60	20
Doramectina (Doramectina)	<i>Codex</i>	150	100	10	30	15
	UE	150	100	40	60	Não permitido ^a
	EUA	-	100	30	-	-
	Canadá	180	70	30	120	-
	Austrália	100	100 ^b	10	-	50
	China	150	100	10	30	Não permitido ^a
	Japão	150	100	10	30	15
Eprinomectina (Eprinomectina B1a)	<i>Codex</i>	250	2000	100	300	20
	UE	250	1500	50	300	20
	EUA	-	1500	100	-	12
	Canadá	500	1000	100	300	20
	Austrália	500	2000 ^b	100	-	30
	China	-	-	-	-	-
	Japão	250	2000	100	300	20
Ivermectina (Ivermectina B1a)	<i>Codex</i>	400	800	30	100	10
	UE	100	100	30	30	Não permitido ^a
	EUA	-	1600	650	-	-
	Canadá	100	70	10	140	-
	Austrália	-	500	200 ^c	60	50
	China	40	100	10	-	10
	Japão	40	100	10	10	10
Moxidectina (Moxidectina)	<i>Codex</i>	500	100	20	50	-
	UE	500	100	50	50	40
	EUA	900	200	50	-	40
	Canadá	550	150	50	400	40
	Austrália	-	500 ^b	1000 ^c	-	2000 ^d
	China	-	-	-	-	-
	Japão	500	100	20	50	40

Todos os valores de LMR são expressos em µg/kg para tecidos e ng/ml para leite.

a = não para uso em animais produtores de leite para consumo humano; b = miúdos comestíveis; c = carne (medido na porção gordurosa); d = leite (medido na porção gordurosa).

Fonte: (FAO/WHO, 2017; EUROPEAN UNION, 2010a; UNIÃO EUROPEIA, 2014; CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2017; CANADÁ, 2015; AUSTRÁLIA, 2012; CHINA, 2002; JAPAN, 2007).

Para garantir que os resíduos de medicamentos estejam abaixo desses LMR nos alimentos de origem animal, intervalos de segurança conhecidos como períodos de carência, precisam ser estabelecidos para cada medicamento veterinário. O intervalo de segurança é

definido como o período de tempo necessário entre a última administração do medicamento aos animais, em condições normais, e a efetiva produção de alimentos provenientes desses animais, a fim de garantir que tais produtos alimentares não contenham resíduos em quantidades superiores aos LMR (UNIÃO EUROPEIA, 2004).

Os períodos de carência são estabelecidos para cada medicamento veterinário assim que são apresentados os estudos de depleção desses resíduos à agência reguladora do país, geralmente como parte de um pedido de autorização de comercialização do medicamento. Os requisitos para estes estudos podem variar de acordo com a legislação aplicável vigente. No caso da UE, a EMA (*European Medicines Agency*) tem publicado um conjunto de diretrizes para a realização de estudos de depleção de resíduos, bem como para a determinação dos períodos de carência, descrevendo as questões mais importantes como o tamanho amostral e tipo de animais que devem ser usados, as doses a serem administradas, o método de amostragem e cálculos estatísticos dos períodos de carência. Além disso, o método analítico utilizado para a extração e a quantificação de resíduos de medicamentos nos estudos de depleção devem ser devidamente validados (ESCRIBANO et al., 2012).

Podem ser encontradas grandes diferenças entre os períodos de carência e LMR de medicamentos veterinários que contenham a mesma substância ativa, isto porque há disponíveis diversos tipos de composições de produtos, diferentes formas de dosagens e vias de administração, variações dentre as espécies-alvo, comportamentos farmacocinéticos, dentre outros aspectos (ESCRIBANO et al., 2012).

Os LMR definidos para as lactonas macrocíclicas em gordura e fígado são maiores do que em tecidos renais e musculares, o que indica que são os tecidos mais indicados para o monitoramento através de análise de resíduos (DANAHER et al., 2006). Porém, diferentes critérios são adotados por várias agências reguladoras sobre a possibilidade do local da injeção ser tratado da mesma forma que outros tecidos em relação à depleção de resíduos.

A partir da visão de inocuidade alimentar humana, uma preocupação importante é o esgotamento lento de resíduos de algumas formulações injetáveis no local de aplicação. Algumas agências reguladoras recomendam que os resíduos do local de injeção em espécies produtoras de alimentos sejam tratados da mesma forma que os outros tecidos comestíveis em relação à depleção de resíduos. Porém, em 9 de junho de 2011, o CVMP (*Committee for Medicinal Products for Veterinary Use*) da EMA adotou uma opinião recomendando que fosse estabelecido um LMR para músculo e também um limite para os locais de injeção. Para isso, um valor de referência do sítio de aplicação ISRRV (*Injection Site Residue Reference Value*) de 1.250 µg/kg foi calculado. Em 25 de outubro de 2011, a Comissão Europeia

solicitou ao Comitê que reconsiderassem o parecer de 9 de junho de 2011 e que alterassem a recomendação da existência de um limite de resíduos para o local da injeção contido em "Outras disposições" do quadro I do anexo do Regulamento (UE) 37/2010, uma vez que seria inviável que as autoridades de controle considerassem dois níveis diferentes para o mesmo tecido (músculo) (EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMA, 2014).

Tendo analisado a questão, o CVMP observou que se fosse feito um cálculo de LMR com base em resíduos esperados no músculo do sítio de injeção isso seria de pouca relevância para as autoridades de controle de resíduos, já que os locais de injeção são escassos, segundo eles (EMA, 2014). Do ponto de vista do controle de resíduos, seria mais sensato basear o LMR de músculo na abordagem de resíduos esperados em outros músculos, excetuando-se o local de injeção, pois isso seria mais representativo. De qualquer forma, o CVMP entendeu que com essa abordagem, mesmo cumprido o período de carência, ainda assim seria possível encontrar resíduos no local de injeção (EMA, 2014).

A chance de um produto contendo sítio de injeção ser amostrado por uma autoridade de controle de resíduos levaria a um achado de violação com possível ação punitiva contra o processador e contra o pecuarista, porém essa ação seria injusta, uma vez que a constatação da não conformidade não representa o descumprimento do período de carência (REEVES, 2007).

As autoridades de licenciamento na Austrália, Canadá e EUA presumiram que a incidência projetada dos resíduos do local de injeção ingeridos pelos consumidores é extremamente pequena e identificaram o risco para o consumidor como o de uma toxicidade aguda do resíduo (REEVES, 2007). Na ausência de provas diretas, várias estimativas foram feitas sobre a probabilidade de um consumidor ingerir a porção muscular do sítio de aplicação. Com base em dados da Nova Zelândia, Brown (2000) sugeriu que resíduos do local de injeção são ingeridos entre uma vez a cada 1,8 anos e uma vez a cada 45 anos. Mais recentemente, Sanquer, Wackowicz e Havrileck (2006), usando uma abordagem probabilística, estimaram que na Europa há menos de 1% de probabilidade de consumo do sítio de aplicação por mais de quatro vezes em um ano, e que no mesmo período, 37% dos consumidores europeus não faria nenhuma ingestão. Embora tais estimativas sejam necessárias, elas geralmente envolvem muitas pressuposições.

2.3 Implicações da falta de harmonização dos programas de vigilância de resíduos no comércio internacional de carne

Os LMR nacionais para cada molécula e para cada *comodity* podem diferir substancialmente de um país para outro, o que geralmente reflete diferentes padrões de inocuidade alimentar adotados pelos governos, bem como diferenças no processo de execução dos programas de vigilância tanto interna, como para importação de produtos. Isto pode acontecer quando um medicamento passa pelo processo de testes e regulamentação em países onde as doenças ou pragas para os quais é indicado têm baixa ocorrência.

A maioria dos países importadores executam programas de inspeção nos portos de entrada, como forma de garantir que os produtos cárneos importados sejam produzidos em padrões equivalentes aos que se aplicam em seu país. Porém, diferenças entre os padrões específicos para cada território afetam o comércio internacional, exigindo que os países exportadores cumpram uma ampla gama de padrões impostos unilateralmente pelos importadores (REEVES, 2007).

Os LMR elaborados pela Comissão do *Codex Alimentarius* facilitam práticas justas no comércio de alimentos, enquanto protegem a saúde do consumidor e são compatíveis com as boas práticas estabelecidas no uso de medicamentos veterinários. No entanto, alguns países apenas adotam os LMR do *Codex* de forma limitada (REEVES, 2007).

2.3.1 Violações de LMR de avermectinas em carne brasileira e suas consequentes barreiras técnico-comerciais

No Brasil, historicamente, os elos da cadeia de produção de carne bovina trabalham de forma independente, o que faz com que a indústria transformadora seja responsável por buscar a matéria prima no campo e disponibilizar o produto ao seu consumidor final. Neste contexto, a responsabilidade de entregar um alimento seguro, mesmo sem ter o controle total do manejo desempenhado durante as etapas da produção animal, que é o elo primário desse ciclo, recai sobre a indústria transformadora.

No que se refere às barreiras técnicas e comerciais para o tema de produtos de origem animal com resíduos químicos de medicamentos veterinários acima dos LMR, grande destaque passou a ser dado a partir de 2008, quando o México recusou lotes de carne bovina norte-americana, por apresentarem excesso de cobre. Esse fato fez com que os Estados Unidos revisassem seus limites e passassem a agir com maior rigor no que diz respeito aos

controles de resíduos estabelecidos pelo FSIS (*Food Safety and Inspection Service*) do USDA (*United States Department of Agriculture*). Como resultado, em 2010, muitas partidas de produtos cárneos importados do Brasil foram rejeitadas devido à violação dos LMR de avermectinas nos portos de entrada norte-americanos (RATH et al., 2016).

Os Estados Unidos tinham, em 2010, LMR estabelecido de 10 µg/kg (10 partes por bilhão ou ppb) para ivermectina e neste mesmo ano, o Brasil teve 23 casos de violação em produtos cárneos exportados para este país, o que culminou com a suspensão temporária das exportações brasileiras para os EUA (Ofício Circular 008/2010/CGPE/DIPOA) (BRASIL, 2010a), que foi cancelada apenas em 28 de dezembro de 2010, por meio do Ofício Circular 45/2010/DIPOA (BRASIL, 2010b). O LMR estabelecido para ivermectina em músculo nos EUA foi revisado e atualmente é de 650 µg/kg (650 partes por bilhão ou ppb) (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2017). A alteração se deu após a apresentação de um estudo adicional de toxicologia em humanos feita pelo *sponsor* da molécula ao FDA (*Food and Drug Administration* - agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos).

No mesmo período, autoridades sanitárias da União Europeia promoveram revisão na avaliação do uso de medicamentos veterinários e de seus respectivos períodos de carência, com o objetivo de torná-los mais seguros para os consumidores de produtos de origem animal, deliberando assim LMR para as avermectinas, conforme descrito no Regulamento 37/2010 da Comissão (COOPER et al., 2012).

Também no ano de 2010, foram feitas 19 notificações de resíduos de ivermectina em carne importada do Brasil pela União Europeia, através de seu Sistema de Alerta Rápido da Comissão Europeia para Gêneros Alimentícios e Alimentos para Animais (RASFF - *Rapid Alert System for Food & Feed*). Esse sistema tem a função de notificar os achados laboratoriais de contaminantes acima das concentrações permitidas em alimentos humanos e rações (EUROPEAN UNION, 2010b). Na ocasião, por não haver definição de LMR em músculo pela UE, a Itália rejeitou vários carregamentos por níveis muito abaixo de 10 µg/kg (ppb) até que, a pedido da Comissão, foi emitido parecer às autoridades competentes informando que 20 µg/kg (ppb) poderia ser usado como um nível de aceitação, abaixo do qual as remessas poderiam ser consideradas conformes (COOPER et al., 2012). O LMR estabelecido para ivermectina em músculo na União Europeia, atualmente, é de 30 ppb (EMA, 2014).

Em 14 de julho de 2010, foi publicado o Memo 745/2010 CGPE/DIPOA (BRASIL, 2010c), informando que o Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar do Japão (MHLW)

intensificou a inspeção para monitoramento dos produtos cárneos termo processados de bovinos provenientes do Brasil e, em 21 de outubro de 2010, houve uma comunicação do Japão sobre duas violações do LMR em produtos do Brasil, o que desencadeou a inspeção de 100% das cargas (BRASIL, 2010d).

Dessa forma, com a publicação dos Ofícios Circulares 139/2010/CHC/CGPE/DIPOA e 036/2010/DIPOA (BRASIL, 2010d, 2010e) passou a ser exigida a apresentação de resultados de análise de resíduos de ivermectina de cada lote, como pré-requisito à certificação das exportações para os EUA e Japão.

Em novembro de 2011, o presidente da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC) relatou que os frigoríficos exportadores brasileiros acumulavam prejuízo de 104 milhões de dólares somente em decorrência de rejeição de cargas por parte dos Estados Unidos, devido à presença de resíduos de medicamentos antiparasitários à base de avermectinas acima dos limites tolerados pelas autoridades norte-americanas (AGÊNCIA ESTADO, 2011).

No Brasil, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), instituído pela Portaria Ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986 e readequado pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995, publicado através da Instrução Normativa SDA Nº 42, de 20 de dezembro de 1999, tem o objetivo precípua de promover a garantia de qualidade do sistema de produção de alimentos de origem animal ao longo da cadeia produtiva (BRASIL, 1999). Este programa determina amostragem homogênea e aleatória dos diversos tecidos e espécies animais monitoradas, bem como de análises laboratoriais nos, aproximadamente, 4.800 estabelecimentos sob SIF (Serviço de Inspeção Federal) no Brasil (BRASIL, 2018).

Quando ocorre uma detecção de resíduo acima do LMR estabelecido, ou em caso de constatação de substâncias de uso proibido, é iniciado o subprograma de investigação, com ações diretas nas propriedades rurais e nos estabelecimentos de abate, visando identificar as possíveis causas da violação e evitar recorrências (BRASIL, 1999).

Uma das prerrogativas do PNCRC consiste em demonstrar equivalência de sistemas aos países importadores, ou seja, atender aos requisitos de qualidade e inocuidade praticados e exigidos por estes mercados, provendo assim, reconhecimento e garantia mútuos (BRASIL, 1999).

Além das ações governamentais conduzidas pelo MAPA, é responsabilidade da indústria processadora garantir um nível seguro de proteção da saúde dos seus consumidores e atender aos requisitos acordados com os clientes importadores, para tanto é necessário que se

tenha conhecimento sobre essa área de estudo para que se estabeleça um plano de amostragem, análises e ações corretivas e preventivas em caso de detecção de violações.

Por meio do Ofício Circular 016/2010/DIPOA (BRASIL, 2010f), de 04 de junho de 2010, o DIPOA orientou os estabelecimentos produtores de matérias primas e produtos termo processados habilitados a exportarem para os Estados Unidos que efetuassem revisão e revalidação do plano APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), focando os perigos químicos e as medidas a serem adotadas em caso de presença de resíduos de produtos veterinários e contaminantes ambientais.

Muitas outras ações foram publicadas pelo DIPOA por meio de Ofícios Circulares. Entre outros, o Ofício Circular 018/2010/DIPOA, 15 de junho de 2010, determinou que a etapa de recepção de animais fosse reconhecida como um ponto de controle (PC) e, portanto, que fosse monitorada em programa de pré-requisito (BRASIL, 2010g). O Ofício Circular 022/2010/DIPOA, de 23 de julho de 2010, publicou o programa oficial de análise de avermectinas em amostras de músculo bovino (BRASIL, 2010h). O Ofício Circular 196/2010/CHC/DIPOA, de 21 de setembro de 2010, determinou que além do estabelecimento de Ponto Crítico de Controle (PCC) químico, os abatedouros selecionassem apenas animais acompanhados com cartas de garantia assinadas pelos pecuaristas, com informações sobre o uso de medicamentos veterinários, que realizassem auditorias nas propriedades rurais fornecedoras e também que a indústria realizasse testes para pesquisa de ivermectina em amostras coletadas durante o abate, entre outros requisitos (BRASIL, 2010i). O Ofício Circular 198/2010/CHC/CGPE/DIPOA, de 22 de setembro de 2010, determinou aos SIF que realizassem colheita de amostras de produtos termoprocessados para análise em laboratórios credenciados pela Coordenação de Apoio Laboratorial (CGAL) (BRASIL, 2010j).

A Instrução Normativa SDA Nº 48, de 28 de dezembro de 2011, determinou a proibição, em todo o território nacional, do uso em bovinos de corte criados em regime de confinamentos e semi-confinamentos, de produtos antiparasitários que contenham em sua formulação princípios ativos da classe das avermectinas, cujo período de carência descrito na rotulagem fosse maior que 28 dias. A proibição prevista se aplica também ao uso em bovinos de corte criados em regime extensivo na fase de terminação (BRASIL, 2011).

Houve ainda a publicação da Instrução Normativa Nº 13, de 30 de maio de 2014, que proibiu a fabricação, manipulação, fracionamento, comercialização, importação e uso de produtos antiparasitários de longa ação que contivessem, como princípio ativo, lactonas macrocíclicas (avermectinas) para uso veterinário (BRASIL, 2014). Porém, em 27 de março

de 2015, foi publicada a Instrução Normativa Nº 6 BRASIL, 2015), revogando a IN Nº 13 e, portanto, a proibição imposta.

Segundo Prata (2014), o conjunto de medidas mitigatórias da ocorrência de violações internacionais tem apresentado alguns resultados satisfatórios, no sentido de direcionamento da produção para a exportação de acordo com as exigências dos mercados, contudo ainda insuficiente, o que acaba se constituindo em um fator de imprevisibilidade para a indústria nacional da carne bovina.

2.4 Resíduos de ivermectinas em produtos enlatados termicamente processados

Embora haja muita informação sobre a presença de resíduos de drogas veterinárias nos alimentos, são menos abundantes os trabalhos publicados a respeito do efeito do processamento tecnológico sobre o comportamento de resíduos de medicamentos antiparasitários em matrizes comestíveis. Alguns estudos sobre o efeito do aquecimento em resíduos de medicamentos antiparasitários como levamisole, oxifendazol e ivermectina foram realizados por Slanina et al., 1989; Rose et al., 1995; Rose; Shearer; Farrington, 1997; Rose; Farrington; Shearer, 1998).

Imperiale et al. (2009) testaram as concentrações de resíduos de ivermectina antes e após o tratamento térmico de amostras de leite de ovelhas (65°C durante 30 minutos e 75°C por 15 segundos) e nenhuma evidência de perda química foi obtida em nenhum dos tratamentos térmicos avaliados. A estabilidade dos compostos parentais no leite foi evidenciada pela falta de produtos de bioconversão (metabólitos), após ambos os tratamentos térmicos. Em conclusão, reportaram que as concentrações de resíduos de lactonas macrocíclicas não são afetadas por procedimentos térmicos em leite, assim como concluíram Cerkvenik et al. (2001).

Resíduos de ivermectina em diferentes tecidos de animais, como músculo e fígado, se mostraram estáveis em condições de cozimento (micro-ondas, fritura, fervura), segundo Rose, Farrington e Shearer (1998), que concluíram que as concentrações de ivermectina obtidas em tecidos crus poderiam ser aplicáveis também a tecidos cozidos, uma vez que nem aumento nem perda foram observados.

Por outro lado, segundo Fisher e Mrozik (1989), se as condições de pH e temperatura forem adequadas e em tempo suficiente, as ivermectinas podem se transformar em suas respectivas moléculas agliconas, tornando-se indetectáveis com as condições cromatográficas comumente usadas para a detecção de endectocidas. As moléculas de aglicona apresentam um

tempo de retenção diferente, aparecendo no início do cromatograma e podendo ser confundidas com outras moléculas.

Cooper et al. (2011) testaram a cocção de carne e fígado por dois métodos diferentes, (assar por 40 min a 190°C) e fritura rasa (músculo 8-12 minutos, fígado 14-19 minutos). As temperaturas internas dos produtos variaram de 55 a 96°C. Foram analisados tecidos crus, cozidos e os seus sucos exsudados. Como conclusão, não foram observadas perdas sensíveis de resíduos de oxiclozanida, clorsulon, closantel, albendazol, mebendazol, fenbendazol e nem de ivermectina nestes processos. Os autores descrevem que não se pode descartar que os resíduos de quaisquer compostos perdidos durante o cozimento, estão de fato, sendo convertidos em produtos não identificados, com toxicidade igual ou maior e ainda que o aumento aparente na concentração de resíduos, durante o cozimento, pode ser devido à conversão de metabólitos não identificados em moléculas como as dos marcadores específicos dos resíduos (COOPER et al., 2011) ou pela perda de água e consequente concentração de sólidos.

Ao contrário destes achados, os resultados de Moreira (1998) indicaram que a perda de resíduo de ivermectina na carne moída pode chegar até 60%, após tratamento com forno de micro-ondas. Slanina et al. (1989) observaram perdas de ivermectina de até 50% em músculo bovino moído após fervura ou fritura, porém, há que se considerar que nestes estudos não foram realizadas análises dos sucos exsudados da carne, gerados com a cocção.

Segundo Cooper et al. (2011), a migração de resíduos de medicamentos para os sucos gerados, durante o cozimento é um aspecto de difícil controle para ser avaliado com precisão e a geração de exsudado varia com o tipo de carne e de cocção, sendo afetado por muitos fatores, como o teor de gordura e água do tecido, temperatura de cozimento, tratamento físico do tecido (fatiamento, moagem, etc.) e a embalagem, se houver.

Produtos cárneos enlatados esterilizados comercialmente são obtidos por uma das técnicas de processamento mais comumente empregada para a conservação de alimentos, especialmente os de origem animal e são amplamente consumidos. Mais informações relativas ao efeito do aquecimento sobre este tipo de processo térmico são necessárias para se determinar estimativas mais precisas da exposição do consumidor a residuais de medicamentos veterinários.

2.5 Metodologias utilizadas para análise de resíduos

Diversos métodos analíticos têm sido relatados na literatura sobre o isolamento de resíduos de LM, a partir dos tecidos comestíveis de animais produtores de alimentos. Fígado e músculo são os mais frequentemente selecionados para inspeção de produtos de origem animal, uma vez que são os tecidos onde os resíduos ocorrem em concentrações mais elevadas, como no caso do fígado, ou são as mercadorias mais comercializadas, como no caso dos músculos (DANAHER et al., 2006).

O uso de análises em músculo para programas de inspeção de resíduos pode ser questionado, devido à variabilidade na concentração das substâncias, especialmente em relação aos sítios de aplicação (SLANINA et al., 1989). Além disso, a diferente proporção de gordura nos músculos é a razão para a distribuição irregular dos resíduos nos diferentes cortes. Ademais, o teor de gordura no músculo também é influenciado pela idade, espécie, raça, nutrição e manejo animal e, portanto, a quantidade de resíduos que pode ser encontrada, varia de acordo com essas circunstâncias (ESCRIBANO et al., 2012).

Alternativamente, a gordura pode ser selecionada para fins de vigilância, mas poucos programas de vigilância e métodos analíticos foram relatados usando este tecido (DANAHER et al., 2012).

No que se refere a métodos qualitativos ou semi quantitativos, os primeiros anticorpos monoclonais para imunoenaios de avermectinas foram relatados por Schmidt et al. (1990). Crooks et al. (1998) desenvolveram ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* ou Ensaio de Imunoabsorção Enzimática) competitivo para a determinação de ivermectina em fígado de bovino, utilizando um anti-soro policlonal criado em coelhos, por outro lado, Shi et al. (2006) desenvolveram um ELISA indiretamente competitivo. Samsonova et al. (2002) descreveram método de determinação de ivermectina em fígado bovino através de imunobiosensor óptico. Além destes, triagem semi-quantitativa pelo método TLC (*Thin layer chromatography* ou Cromatografia em Camada Delgada) para ivermectina foi descrita por Abjean e Gaugain (1995).

Com relação aos ensaios químicos quantitativos, resíduos de drogas farmacêuticas ou os seus metabolitos são tipicamente determinados diretamente por cromatografia líquida (CL) com detecção por UV (ultra violeta) ou espectrometria de massas. Alternativamente, as amostras podem ser derivatizadas para produzir molécula fluorescente, antes da determinação por CL, para a detecção desta por fluorescência. Detecção por UV é conhecida por ser muito robusta e pode ser facilmente aplicada à LM não derivatizadas, no entanto, quando se

analisam os baixos níveis destas drogas no plasma, tecidos e leite, a detecção por UV pode não proporcionar a especificidade requerida (DANAHER et al., 2012).

Foram desenvolvidos métodos através de pré-coluna de derivatização com detecção de fluorescência, proporcionando maior sensibilidade e seletividade do que a detecção por UV. Como resultado, a fluorescência é preferida à UV para a detecção de resíduos de LM em baixas concentrações. A derivatização envolve reação das lactonas macrocíclicas com reagentes não fluorescentes para produzir derivados fluorescentes com base neste princípio. Uma série de procedimentos de derivatização foram desenvolvidos ao longo dos últimos vinte anos (DANAHER et al., 2012).

Nos últimos anos, vários métodos de LC-MS/MS (*Liquid chromatography - Tandem mass spectrometry*, ou Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial) têm sido desenvolvidos para a determinação de LM. Estes métodos são mais confiáveis no que diz respeito à confirmação, mas nem tanto com relação à sensibilidade e quantificação (TURNIPSEED et al., 2005) e um número crescente de MS/MS (*Tandem mass spectrometry*) e TOF (*Time of flight*) acoplado a HPLC (*High Performance Liquid Chromatography* ou Cromatografia líquida de alta eficiência) ou UPLC (*Ultra performance liquid chromatography* ou Cromatografia Líquida de Ultra Performance) têm sido publicados (GRIMALT et al., 2005; HE et al., 2009; HERNANDO et al., 2007; HOU et al., 2006).

A maioria dos ensaios são baseados em extração dos resíduos de LM utilizando-se acetonitrila e cartuchos absorventes C8, C18 ou HLB (*Hydrophilic-lipophilic balance* ou Sistema de Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico). A maior parte dos processos modernos são baseados no procedimento de limpeza em C8, desenvolvido por Nordlander e Johnson (1990). Este procedimento foi adaptado para a C18, pois fornece mais forte sorção de co-extrativos não-polares. O uso de cromatografia líquida gradiente é recomendado em métodos analíticos para reduzir picos de *carry-over* nas matrizes, particularmente para o tecido hepático (DANAHER et al., 2012).

LM não são determinadas somente em métodos específicos, mas também como parte de métodos multi-resíduos (usando procedimento de limpeza da coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida com detector de fluorescência), que abrangem diferentes classes de medicamentos farmacêuticos ativos, com fins de rastreio e posterior confirmação (KINSELLA et al., 2009; INOUE et al., 2009; WHELAN et al., 2010). Em geral, mais e mais métodos de vários resíduos serão desenvolvidos no futuro. Esses ensaios serão particularmente úteis no monitoramento da exposição em tempo real aos resíduos de medicamentos veterinários (DANAHER et al., 2012).

3 HIPÓTESES

Ivermectina apresenta dinâmica de depleção diferente de eprinomectina em tecidos comestíveis.

Alguns tecidos comestíveis apresentam concentração de ivermectina e eprinomectina superior ao LMR nos tecidos-alvo, mesmo após o cumprimento do período de carência estabelecido.

Conservas cárneas (após tratamento térmico) apresentam concentrações de ivermectina e eprinomectina diferentes dos tecidos alvo *in natura*.

4 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a concentração de resíduos dos princípios ativos ivermectina (convencional e longa ação) e eprinomectina em diversos tipos de tecidos comestíveis, analisados em diferentes períodos pós-aplicação, em bovinos de corte zebuínos (*Bos indicus*).

Os objetivos específicos foram:

- (a) Verificar se existe diferença entre a dinâmica de depleção de eprinomectina *por on*, ivermectina convencional e ivermectina longa ação nos tecidos-alvo avaliados;
- (b) Investigar se o período de carência estabelecido garante o esgotamento a níveis abaixo dos limites máximos determinados em todos os tecidos comestíveis pesquisados;
- (c) Conhecer o nível de correlação entre os resultados de concentração de resíduos no fígado e no músculo (cortes cárneos comerciais);
- (d) Avaliar a possibilidade de se utilizar esta correlação entre fígado e músculo em programas de vigilância dentro da indústria de processamento de carne bovina.
- (e) Analisar se a concentração dos princípios ativos ivermectina e eprinomectina é afetada pelo processamento térmico (esterilização comercial em autoclaves);
- (f) Avaliar se é coerente considerar para produtos enlatados, os mesmos limites determinados para produtos *in natura*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

As publicações originadas deste trabalho passarão por análise do Comitê de Ética.

5.1 Local

O experimento foi conduzido no confinamento Malibu da empresa JBS, localizado na cidade de Castilho, estado de São Paulo. Os abates e coleta de amostras ocorreram no Matadouro Frigorífico da empresa JBS, unidade de Lins, estado de São Paulo, com a autorização do Serviço de Inspeção Federal. A distância entre o confinamento onde o experimento foi conduzido e planta de abate onde as amostras foram coletadas é de aproximadamente 150 km.

5.2 Animais

Os animais selecionados para esse estudo foram provenientes de um lote de 316 animais machos, não castrados, com características da raça Nelore, com média de 27 meses de idade e peso inicial médio de 422,71 kg; todos oriundos de um mesmo produtor rural e sem histórico de vermifugação. Após chegarem ao confinamento, os animais foram pesados e então foram selecionados 168 animais de acordo com os seguintes critérios:

- Apenas animais Nelore;
- Peso inicial entre 390 e 460 kg;
- Sem problemas de locomoção ou enfermidade aparente.

Adicionalmente foram selecionados 15 animais que permaneceram junto ao lote, para eventuais substituições de refugos de cocho, mortos ou machucados. Estes animais ficaram disponíveis para a substituição durante o período de adaptação (14 dias). Após esse período foi estabelecido o 0 D (primeiro dia da aplicação dos medicamentos para o teste), em que se iniciou efetivamente o experimento.

5.3 Descrição dos grupos experimentais

Os animais previamente selecionados foram divididos em 3 grupos experimentais de acordo com o tipo de princípio ativo a ser administrado. Foi realizada aplicação subcutânea de ivermectina (convencional e longa ação) e *pour on* de eprinomectina.

- Tratamento do grupo 01 (IVM-CO = ivermectina convencional): ivermectina comercial injetável. Número da partida AA271/12; número do lote 0335/03.
Período de carência indicado pelo fabricante de 35 dias;
- Tratamento do grupo 02 (EPR-PO = eprinomectina *pour on*): eprinomectina comercial *pour on*. Número da partida: 002/12; número do lote: 2279/01.
Período de carência zero indicado pelo fabricante; e
- Tratamento do grupo 03 (IVM-LA = ivermectina longa ação): ivermectina comercial injetável. Número da partida: AA245/12; número do lote: 0319/04.
Período de carência indicado pelo fabricante de 140 dias.

A aparação ocorreu dentro dos critérios dos grupos de tratamentos, utilizando-se brincos coloridos, conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Identificação dos animais de acordo com os tratamentos a que foram submetidos

Lote	Cor	Quantidade	Caracteres
1	Amarelo	10	Grupo 01 IVM-CO 7 D
1	Amarelo	10	Grupo 01 IVM-CO 15 D
1	Amarelo	10	Grupo 01 IVM-CO 30 D
1	Amarelo	10	Grupo 01 IVM-CO 45 D
1	Verde	8	Grupo 01 IVM-CO Controle
2	Azul	10	Grupo 02 EPR-PO 7 D
2	Azul	10	Grupo 02 EPR-PO 15 D
2	Azul	10	Grupo 02 EPR-PO 30 D
2	Azul	10	Grupo 02 EPR-PO 45 D
2	Vermelho	8	Grupo 02 EPR-PO Controle
3	Branco	10	Grupo 03 IVM-LA 7 D
3	Branco	10	Grupo 03 IVM-LA 30 D
3	Branco	10	Grupo 03 IVM-LA 60 D
3	Branco	10	Grupo 03 IVM-LA 90 D
3	Branco	10	Grupo 03 IVM-LA 120 D
3	Branco	10	Grupo 03 IVM-LA 150 D
3	Laranja	12	Grupo 03 IVM-LA Controle
Total		168	

IVM-CO: ivermectina convencional; EPR-PO: eprinomectina *pour on*; IVM-LA: ivermectina longa ação.

D: dias pós aplicação do medicamento, em que os animais foram enviados para o abate.

Fonte: Própria autoria.

Os medicamentos injetáveis foram aplicados na região do pescoço dos animais, por meio de injeção subcutânea, na dose de 1 ml para cada 50 kg de peso vivo, conferindo a administração de 200 µg/kg (de peso vivo) de ivermectina, conforme indicado na bula.

Após a aplicação dos medicamentos realizou-se a marcação com uso de ferro incandescente no exato local de aplicação. Este procedimento serviu para auxiliar a coleta posterior do tecido muscular do sítio de aplicação no frigorífico.

O medicamento *pour on* foi despejado sobre a pele dos animais em toda extensão do corpo, com pistola aplicadora na dosagem indicada na bula de 1 ml para cada 10 kg de peso vivo, conferindo a dosagem de 500 µg/kg (de peso vivo) de eprinomectina.

O tempo total de permanência dos animais no confinamento foi determinado em função do período de carência estabelecido para cada tipo de princípio ativo utilizado.

Para os animais dos grupos 1 e 2 (ivermectina convencional IVM-CO e eprinomectina *pour on* EPR-PO), o tempo total de permanência no confinamento foi de 45 dias, tendo sido selecionados aleatoriamente e abatidos 12 animais de cada grupo aos 7, 15, 30 e 45 dias após aplicação do medicamento, sendo 10 animais tratados + 2 controles negativos (ou seja, que não receberam nenhum medicamento). Dessa forma, o número total de animais dos grupos 1 e 2 foi de 48 animais cada. Para os animais do grupo 3 (ivermectina longa ação IVM-LA), o tempo de permanência no confinamento foi de 150 dias, tendo sido selecionados aleatoriamente e abatidos 12 animais de cada grupo aos (7, 30, 60, 90, 120 e 150 dias após aplicação), sendo 10 animais tratados + 2 controles negativos (ou seja, que não receberam nenhum medicamento). Dessa forma, o número total de animais do grupo 3 foi de 72 animais. Os grupos experimentais foram distribuídos conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Delineamento experimental do projeto, contendo os números de animais tratados e controles para os três grupos testados, os medicamentos e suas carências, a via de administração e os dias de avaliação pós-aplicação

	Grupo 01 (IVM-CO) Período de carência 35 dias	Grupo 02 (EPR-PO) Período de carência 0 dias	Grupo 03 (IVM-LA) Período de carência 140 dias
Dias de avaliação de resíduos	7	7	7
pós aplicação dos	15	15	30
medicamentos	30	30	60
	45	45	90
			120
			150
Número de animais			
vermifugados por dia de	10	10	10
avaliação			
Número de animais			
controle por dia de avaliação	2	2	2
Via de aplicação	Subcutânea	<i>pour on</i>	Subcutânea
Total de animais	48	48	72

IVM-CO: ivermectina convencional; EPR-PO: eprinomectina *pour on*; IVM-LA: ivermectina longa ação.
Fonte: Própria autoria.

5.4 Abate dos animais experimentais e coleta de amostras

Os abates planejados para ocorrerem nos determinados períodos pós-aplicação dos medicamentos tiveram que sofrer alguns ajustes, em função dos dias úteis, como parte da programação do frigorífico. Dessa forma, os reais períodos pós-aplicação dos medicamentos foram obtidos conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Períodos planejados e reais de avaliação, pós-aplicação dos medicamentos ivermectina convencional (IVM-CO), eprinomectina *pour on* (EPR-PO) e ivermectina longa ação (IVM-LA)

		Dias de avaliação pós-aplicação dos medicamentos (Planejado)	Dias de avaliação pós-aplicação dos medicamentos (Real)
Grupo 01	(IVM-CO)	7	8
		15	15
		30	35
		45	49
Grupo 02	(EPR-PO)	7	8
		15	15
		30	35
		45	49
Grupo 03	(IVM-LA)	7	8
		30	35
		60	63
		90	91
		120	120
		150	154

Fonte: Própria autoria.

Depois de cumpridos os 8, 15, 35, 49, 63, 91, 120 e 154 dias após a administração dos medicamentos no confinamento, cada grupo foi destinado ao abate para coleta das amostras, conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Esquema de distribuição dos abates, em função dos dias pós-administração dos medicamentos

		Dia 8	Dia 15	Dia 35	Dia 49	Dia 63	Dia 91	Dia 120	Dia 154	Total
Grupo 01 (IVM-CO)	Número de animais vermifugados	10	10	10	10	-	-	-	-	
	Número de animais controle	2	2	2	2	-	-	-	-	
	Total Grupo 01	12	12	12	12	-	-	-	-	48
Grupo 02 (EPR-PO)	Número de animais vermifugados	10	10	10	10	-	-	-	-	
	Número de animais controle	2	2	2	2	-	-	-	-	
	Total Grupo 02	12	12	12	12	-	-	-	-	48
Grupo 03 (IVM-LA)	Número de animais vermifugados	10	-	10	-	10	10	10	10	
	Número de animais controle	2	-	2	-	2	2	2	2	
	Total Grupo 03	12	-	12	-	12	12	12	12	72
Total de animais abatidos no dia	Número de animais vermifugados	30	20	30	20	10	10	10	10	
	Número de animais controle	6	4	6	4	2	2	2	2	
	Total do dia	36	24	36	24	12	12	12	12	168

IVM-CO: ivermectina convencional; EPR-PO: eprinomectina *pour on*; IVM-LA: ivermectina longa ação.
Fonte: Própria autoria.

No dia anterior ao abate, os animais foram transportados para o frigorífico e permaneceram nos currais, em dieta hídrica, separados conforme os tratamentos, até o momento do abate; e receberam sua identificação de carcaça assim que foram abatidos (antes da retirada dos brinco). As amostras, ou seja, os tecidos para análise foram coletados em pontos distintos das carcaças, durante as operações de abate e desossa.

Os tecidos coletados durante o abate foram: (i) sítio de aplicação - tecido muscular do local da injeção (*Trapezius cervicalis*), (ii) fígado, (iii) bucho (estômago), (iv) língua, (v) carne de cabeça (músculos *Masseteres* e *Pterigoides*), (vi) carne da região da sangria - grupo muscular do pescoço atingido pela ferida de sangria (*Sternomastoideus* e *Sternomandibularis*), (vii) gordura - extraída da região externa do peito (*Pectoralis superficialis*), (viii) fraldinha (porção costal do diafragma), (ix) lombinho (pilares esquerdo e

direito do diafragma), (x) tendões (estruturas fibrosas de tecido conjuntivo extraídas das patas dianteiras).

Os tecidos coletados durante a desossa foram: (xi) pescoço - massas musculares inseridas nas vertebra cervicais, borda anterior da primeira costela e extremidade anterior do esterno (*Omotransversarius*), (xii) ponta do noix - porções torácicas dos músculos trapézio e romboide e grande dorsal (*Longissimus thoracis*), (xiii) capa do pescoço - massa muscular sobreposta aos músculos do pescoço (*Rhoimboideus cervicalis*), (xiv) miolo do pescoço - músculo longo do pescoço (*longus capiti*), (xv) recortes (porção de qualquer tamanho de carne obtida pela preparação dos cortes da desossa dos quartos traseiro e dianteiro), (xvi) contrafilé (*Longissimus lumborum*), (xvii) coxão duro (*Biceps femoris*), (xviii) lagarto (*Semitendinosus*).

5.5 Análises laboratoriais de resíduos de ivermectina e eprinomectina

O total de análises de resíduos planejado para os 18 tecidos avaliados foi de 3.360 amostras quantificadas e para as análises em produtos enlatados foram avaliadas 80 amostras.

Todas as análises laboratoriais foram realizadas pelo Laboratório Eurofins Scientific (Indaiatuba, São Paulo, Brasil), seguindo método adaptado de Rubensam et al. (2013), o qual utilizou separação cromatográfica através de coluna de fase reversa por HPLC, ionização no sistema LC-MS/MS e detecção por espectrometria de massas. Uma validação completa dos procedimentos analíticos para a extração e quantificação de ivermectina e eprinomectina nos tecidos foi realizada antes da análise das amostras experimentais.

O limite de detecção do método é 2,5 ppb e a faixa de quantificação é de 5,0 a 12.000,0 ppb para todos os compostos.

5.5.1 Reagentes e materiais utilizados

Os reagentes e soluções usados na fase de extração foram metanol e acetonitrila (grau HPLC), ácido tricloroacético e acetato de amônio (grau de pureza PA) e água ultrapurificada (Milli-Q). A coluna usada foi C18 100A Kinetex (Phenomenex) de 2.6µ com tamanho de 50 x 2,1 mm.

Foram usados padrões analíticos de eprinomectina e ivermectina da marca Dr. Enrenstorfer, com pureza de 96% e 97%, respectivamente.

5.5.2 Preparo de curva analítica e controles

Pesou-se 13 alíquotas de carne ($1\text{g} \pm 0,05\text{g}$ cada) em tubo falcon de 15 ml e pipetou-se as alíquotas de padrão de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5 - Níveis de fortificação em amostras brancas para a curva analítica

Ponto da curva	Concentração (ng/g)	Solução utilizada MIX Avermectina (ng/ml)	Volume pipetado (μl)
BR (branco)	-	-	-
P1	2,5	100	25
P2	5,0	100	50
P3	10,0	100	100
P4	25,0	100	250
P5	50,0	1000	50
P6	75,0	1000	75
P7	100,0	1000	100
P8	200,0	1000	200
P9	500,0	2000	250
P10	1000,0	2000	500
Controle limite baixo	20,0	100	200
Controle limite médio	70,0	1000	70
Controle limite alto	150,0	1000	150

Fonte: Própria autoria.

5.5.3 Fluxograma do processo de extração

Todas as amostras foram processadas em equipamento homogeneizador de carnes. O equipamento utilizado foi o da marca Grindomix, modelo GM200. O volume total coletado (aproximadamente 200g) foram totalmente usados na homogeneização e, a partir da massa obtida, 1g foi retirado para a condução da análise.

Foi realizada a extração em cada tecido e produto enlatado. Para todas as matrizes foi utilizado o mesmo método de extração (Figura 1), para a quantificação, foram utilizadas curvas de calibração específicas.

Figura 1 - Fluxograma do processo de extração

Fonte: Própria autoria

5.5.4 Equipamentos utilizados para injeção e detecção de massas

A injeção foi feita em equipamento Degasser, marca Agilent, modelo: 1260 series, com injetor automático e forno de coluna também Agilent. O detector de massas utilizado foi da marca AB SCIEX, modelo API4000 LC/MS/MS System.

A leitura foi realizada utilizando o software Analyst versão 1.5.1 e para o tratamento de dados foi utilizado o software MultiQuant, versão 2.1.

5.6 Avaliação de produtos cárneos enlatados termicamente processados

Amostras de carne de alguns dos tecidos avaliados neste experimento (que são usados habitualmente nas formulações de produtos cárneos termicamente processados) foram analisadas antes e após a esterilização.

Para esse ensaio foram considerados os tecidos tendões, carne de sangria, carne de cabeça e miolo do pescoço e foi conduzido procedimento padrão de preparação de conservas bovinas, comercialmente estéreis comercializadas no mercado.

Para a análise das amostras PRÉ-ESTERILIZAÇÃO considerou-se o seguinte protocolo: as matérias primas cruas (com resultados conhecidos de concentração de resíduos,

obtidas do experimento de depleção anterior) foram moídas em disco de corte com furos de 50,8 mm (2 pol.) de diâmetro, pré-cozidas em água a aproximadamente 98°C durante 10 minutos, moídas em disco de corte com furos de 38,1 mm (3/2 pol) de diâmetro, drenadas, pesadas, acondicionadas em embalagens plásticas identificadas e encaminhadas ao laboratório de análises.

Para a análise das amostras PÓS-ESTERILIZAÇÃO considerou-se o seguinte protocolo: as matérias primas cruas (com resultados conhecidos de concentração de resíduos, obtidas do experimento de depleção anterior abatidos 15 dias após aplicação de IVM-LA e IVM-CO) foram moídas em disco de corte com furos de 50,8 mm (2 pol) de diâmetro, cozidas em água a aproximadamente 98°C durante 10 minutos, moídas em disco de corte com furos de 38,1 mm (3/2 pol) de diâmetro, drenadas, pesadas, acondicionadas em latas de folha de aço estanhada, com formato tronco trapezoidal com capacidade para 340g, recravadas (tornando-se hermeticamente fechadas) e então esterilizadas a 125°C por 65 minutos em retortas verticais da planta de processamento industrial da empresa JBS (unidade de Lins-SP).

Foram preparadas ao todo 80 amostras, sendo para cada tecido: 2 amostras controle (com tecido oriundo de animal não tratado com ivermectina) enviadas para análise ANTES DA ESTERILIZAÇÃO; 3 latas com amostras controle enviadas para análise APÓS A ESTERILIZAÇÃO; 5 amostras com resíduo de ivermectina (de tecidos oriundos de animais que receberam tratamento com ivermectina), enviadas para análise ANTES DA ESTERILIZAÇÃO; e 6 latas com amostras com resíduo de ivermectina (de tecidos oriundos de animais que receberam tratamento com ivermectina), enviadas para análise APÓS A ESTERILIZAÇÃO, conforme Tabela 6.

Os controles foram usados para fazer o acompanhamento e confirmação de ausência de resíduos em contraposição às amostras contendo resíduo de ivermectina, a fim de testar se o método poderia apresentar algum tipo de falha.

Tabela 6 - Número de amostras preparadas para análise da concentração de ivermectina antes e após processo térmico de esterilização

	Controle Pré-esterilização	Controle Pós-esterilização	Com Ivermectina Pré-esterilização	Com ivermectina Pós-esterilização	Total
Tendões	2	3	5	6	16
Carne de sangria	2	3	5	6	16
Carne de cabeça	2	3	5	6	16
Miolo do pescoço	2	3	5	6	16

Fonte: Própria autoria.

5.7 Análises estatísticas

O tamanho amostral aproximado de 168 animais foi previamente estabelecido para este estudo utilizando as recomendações de Cochran e Cox (1967).

5.7.1 Análises estatísticas dos resultados de depleção de resíduos de ivermectina e eprinomectina em diferentes tecidos

Conforme recomendações de Banzatto e Kronka (2006), para a avaliação das concentrações de ivermectina e de eprinomectina nas amostras foi utilizada transformação de escala “logaritmo natural dos valores de concentração de ivermectina + 1” (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) e “logaritmo natural dos valores de concentração de eprinomectina + 1” (LN_EPR-PO), após avaliação da normalidade e da homocedasticidade dos dados, procedendo-se então, à análise de variância e análises de regressão com os dados transformados.

Para avaliação das concentrações de ivermectina e de eprinomectina em escala transformada, segundo os grupos comparativos, foi adotado um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), em esquema fatorial 18 (tecidos) x 4 (períodos pós aplicação do medicamento) para os Grupos 1 e 2 ou 18 (tecidos) x 6 (períodos pós aplicação do medicamento) para o Grupo 3, de acordo com o modelo abaixo especificado.

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + D_j + TD_{ij} + e_{ijk}$$

em que,

Y_{ijk} = é o valor observado para as concentrações de ivermectina (ou eprinomectina) em escala transformada (LN_IVM-CO; LN_IVM-LA; LN_EPR-PO) relacionada ao animal k, no dia após aplicação j, no tipo de tecido i;

μ = constante inerente a todas as observações (média);

T_i = é o efeito do i-ésimo tecido avaliado, sendo i=1(sítio de aplicação), 2 (fígado), ..., 17 (coxão duro), 18 (lagarto);

D_j = é o efeito do j-ésimo dia após aplicação de ivermectina ou eprinomectina, sendo j=1 (07 dias), 2 (15 dias), 3 (30 dias) e 4 (45 dias) para os Grupos 1 e 2 ou j=1 (07 dias), 2 (30 dias), 3 (60 dias), 4 (90 dias), 5 (120 dias) e 6 (150 dias) para o Grupo 3;

TD_{ij} = é o efeito da interação dupla entre o tipo de tecido i e o dia após aplicação j;

e_{ijk} = é o erro experimental associado ao relacionada ao animal k, no dia após aplicação j, no tipo de tecido i, suposto NIID $(0, \sigma^2_e)$.

Valores inferiores ao limite mínimo de quantificação da técnica utilizada (concentrações <5 ppb) foram transformados em 5 ppb para fins de análises estatísticas e, valores superiores ao limite máximo de quantificação da técnica analítica (concentrações >12.000 ppb) foram transformados em 12.000 ppb.

Todas as análises foram realizadas usando procedimento Proc Mixed do Programa SAS, versão 9.4 (SAS Institute).

5.7.2 Análises estatísticas para obtenção de estimativas de correlação de resíduos de ivermectina entre fígado e músculo

Conforme recomendações de Banzatto e Kronka (2006), para avaliação das concentrações de ivermectina e eprinomectina nas amostras, utilizou-se a transformação de escala “logaritmo natural dos valores de concentração de ivermectina” (LN_IVM-CO; LN_IVM-LA), após avaliação da normalidade e da homocedasticidade dos dados, procedendo-se então, às análises de correlação linear momento-produto de *Pearson*, bem como, análises de regressão com os dados transformados de fígado, carne de sangria, coxão duro, lagarto, recortes e contrafilé.

Todas as análises foram realizadas usando procedimento Proc Mixed e Corr do Programa SAS, versão 9.4 (SAS Institute).

5.7.3 Análises estatísticas dos resultados de concentração de resíduos em produtos cárneos enlatados termicamente processados

Para avaliação das concentrações de ivermectina em escala original, segundo os grupos comparativos, foi adotado um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), em esquema fatorial 5 x 2, de acordo com o modelo abaixo especificado.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + M_j + TM_{ij} + e_{ijk}$$

em que,

Y_{ijk} = é o valor observado para as concentrações de ivermectina em escala original relacionada à amostra k, no momento j, no tipo de tecido i;

μ = constante inerente a todas as observações (média);

T_i = é o efeito do i-ésimo tecido avaliado, sendo $i=1$ (carne de cabeça), 2 (miolo do pescoço), 3 (carne de sangria) ou 4 (tendões);

M_j = é o efeito do j-ésimo momento do termo processamento, sendo $j=1$ (antes do processamento térmico) e 2 (depois do processamento térmico);

TD_{ij} = é o efeito da interação dupla entre o tipo de tecido i e o momento do processamento térmico j ;

e_{ijk} = é o erro experimental associado ao relacionada à amostra k , no momento j e no tipo de tecido i , suposto NIID $(0, \sigma_e^2)$.

Para essas análises foram consideradas que as unidades experimentais foram as mesmas, caracterizando estrutura de medida repetidas nas mesmas unidades experimentais. A estrutura de covariância utilizada foi a matriz não-estruturada.

Como se trata de diferentes tecidos avaliados antes e depois do tratamento térmico, em caso de Teste F significativo, procedeu-se a comparação de médias (Tukey). Todas as análises foram realizadas usando procedimento PROC MIXED do Programa SAS, versão 9.4 (SAS Institute).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Dinâmica de depleção de resíduos de ivermectina e eprinomectina em diferentes tecidos

Os números de observações (N) e as estimativas de médias, desvios padrão (DP), coeficientes de variação (CV), mínimo (Min) e máximo (Max) para as variáveis concentrações das ivermectinas convencional e longa ação e eprinomectina, em escala original (IVM-CO, IVM-LA e EPR-PO), encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Estatísticas descritivas para a variável concentração (em ppb) de ivermectina e eprinomectina em escala original (IVM-CO, IVM-LA e EPR-PO), para ivermectina convencional, ivermectina longa ação e eprinomectina pour on, em cada tecido avaliado, considerando todos os períodos de carência (pós aplicação do medicamento) testados (*continua*)

Tecido	Variável	N	Média	DP	CV	Min	Max
Carne sangria	IVM-CO	40	11,563	14,101	121,950	5,000	66,400
	EPR-PO	38	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	60	13,210	16,569	125,429	5,000	63,400
Coxão duro	IVM-CO	40	8,530	6,386	74,866	5,000	26,800
	EPR-PO	38	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	60	10,438	11,122	106,553	5,000	50,000
Lagarto	IVM-CO	40	7,595	4,722	62,166	5,000	27,000
	EPR-PO	38	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	60	7,870	6,228	79,139	5,000	30,100
Recortes	IVM-CO	40	13,385	11,601	86,672	5,000	32,100
	EPR-PO	30	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	60	15,507	18,660	120,335	5,000	56,250
Contrafilé	IVM-CO	40	10,115	7,684	75,971	5,000	32,300
	EPR-PO	38	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	60	13,910	17,729	127,455	5,000	74,900
Fraldinha	IVM-CO	39	14,054	14,479	103,026	5,000	58,900
	EPR-PO	38	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	59	17,681	24,042	135,975	5,000	86,300
Sítio Aplicação	IVM-CO	40	1331,390	3320,970	249,436	5,000	12000,000
	EPR-PO	38	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	60	1929,380	4138,330	214,491	5,000	12000,000
Lombinho	IVM-CO	38	19,087	20,331	106,516	5,000	72,500
	EPR-PO	37	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	59	21,390	31,510	147,315	5,000	104,100

Tabela 7 - Estatísticas descritivas para a variável concentração (em ppb) de ivermectina e eprinomectina em escala original (IVM-CO, IVM-LA e EPR-PO), para ivermectina convencional, ivermectina longa ação e eprinomectina *pour on*, em cada tecido avaliado, considerando todos os períodos de carência (pós aplicação do medicamento) testados (*conclusão*)

Tecido	Variável	N	Média	DP	CV	Min	Max
Miolo Pescoço	IVM-CO	40	13,445	12,162	90,459	5,000	51,500
	EPR-PO	38	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	60	34,003	146,804	431,733	5,000	1143,600
Ponta Noix	IVM-CO	40	13,643	10,716	78,547	5,000	37,200
	EPR-PO	38	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	60	22,717	30,461	134,089	5,000	105,400
Tendões	IVM-CO	40	6,513	1,915	29,401	5,000	11,100
	EPR-PO	38	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	60	6,187	3,422	55,305	5,000	24,300
Pescoço	IVM-CO	40	8,670	5,612	64,724	5,000	24,600
	EPR-PO	38	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	60	8,325	7,056	84,751	5,000	34,800
Capa Pescoço	IVM-CO	40	6,258	2,602	41,574	5,000	13,900
	EPR-PO	38	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	58	13,435	21,744	161,849	5,000	153,300
Bucho	IVM-CO	30	5,053	0,229	4,523	5,000	6,200
	EPR-PO	28	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	50	5,000	-	-	5,000	5,000
Gordura	IVM-CO	40	16,065	15,814	98,437	5,000	55,800
	EPR-PO	38	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	60	27,002	42,582	157,702	5,000	190,700
Língua	IVM-CO	40	15,330	16,013	104,458	5,000	63,000
	EPR-PO	38	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	60	21,682	32,872	151,612	5,000	130,900
Carne cabeça	IVM-CO	40	9,340	6,587	70,519	5,000	25,600
	EPR-PO	38	5,000	-	-	5,000	5,000
	IVM-LA	60	10,710	12,266	114,527	5,000	43,300
Fígado	IVM-CO	40	158,523	298,564	188,342	5,000	1450,500
	EPR-PO	108	7,036	5,026	71,430	5,000	27,800
	IVM-LA	48	39,835	45,623	114,528	5,000	171,300

N (Número de amostras). DP (Desvio Padrão). CV (Coeficiente de Variação). Min (Mínimo). Max (Máximo).
Fonte: Própria autoria.

Conforme apresentado no item 5.5 do Material e métodos, a faixa de quantificação do método analítico usado para a obtenção dos resultados de concentração de resíduos de ivermectina e eprinomectina vai de 5 a 12.000 ppb, portanto, todos os resultados abaixo de 5 ppb ou acima de 12.000 ppb foram expressos como 5 ppb ou 12.000 ppb para fins de apresentação em tabelas e <5 ppb e >12.000 ppb para discussão.

Ao se avaliar as concentrações máximas de ivermectina (Tabela 7), verifica-se bastante variação dentre os tecidos analisados, alguns tecidos apresentaram concentrações máximas mais baixas que os demais, como é o caso do bucho e dos tendões (quer seja para IVM-CO ou para IVM-LA), enquanto que outros, apresentaram bem mais elevadas concentrações máximas, como o lombinho, carne de sangria, fígado e sítio de aplicação para IVM-CO e miolo do pescoço, gordura, fígado e sítio de aplicação para IVM-LA.

Vários estudos de depleção de resíduos, mesmo em outras espécies, corroboram os achados deste experimento (CHIU et al., 1986, 1988, 1990). Segundo estes autores o padrão de distribuição pelos tecidos foi essencialmente o mesmo em todas essas espécies, com maiores níveis de resíduos de ivermectina sendo encontrados em gordura e fígado. Seus resultados demonstram que a taxa de eliminação variou entre as espécies com valores médios de meia vida de 7,6 e 4,8 dias para gordura e fígado em gado, respectivamente, e 1-2 dias em ovelhas e ratos para ambos os tecidos.

Os achados deste experimento refletem padrões diferenciados de distribuição de resíduos em cada tecido avaliado, corroborando com as explicações de Ong, Liu e Pidgeon (1996) sobre a influência da quantidade de lipídeos presente nos diferentes tecidos e o fato das avermectinas serem moléculas lipofílicas, determinando, portanto, a velocidade de absorção destes compostos pelo organismo. Como poder ser observado na Tabela 7, os tecidos bucho e tendões, que apresentaram as menores concentrações de ivermectina, são tecidos com baixas porcentagens de gordura. Já com relação ao fígado, seus elevados valores de concentração se devem ao fato de que grande parte desses complexos são levados para o fígado, via transporte reverso do colesterol para sua metabolização (BASSINI; ALVINERIE; LESPINE, 2004).

Um achado importante deste experimento são as concentrações extremamente elevadas para a matriz sítio de aplicação para ambas as ivermectinas avaliadas (IVM-CO e IVM-LA), que será discutido mais adiante neste tópico.

Todos os 18 tecidos foram analisados quanto à concentração de ivermectina e eprinomectina visando obtenção de funções de depleção ao longo dos dias avaliados pós-aplicação, e os resultados podem ser encontrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Estimativas de médias das concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e de longa ação (IVM-LA) e eprinomectina *pour on* (EPR-PO) (em ppb), nos tecidos avaliados ao longo dos dias após a aplicação de cada princípio ativo (*continua*)

	Dias pós- abate	IVM-CO	EP		EPR-PO	EP		Dias pós- abate	IVM-LA	EP	
Carne sangria	8	19,459	0,163	A	5,000	0,000	A	8	46,321	0,059	A
	15	8,252	0,163	B	5,000	0,000	A	35	10,342	0,059	B
	35	5,000	0,163	B	5,000	0,000	A	63	5,483	0,059	C
	49	5,000	0,163	B	5,000	0,000	A	91	5,000	0,059	C
								120	5,000	0,059	C
								154	5,000	0,059	C
Coxão duro	8	17,147	0,074	A	5,000	0,000	A	8	25,904	0,131	A
	15	5,749	0,074	B	5,000	0,000	A	35	8,702	0,131	B
	35	5,000	0,074	B	5,000	0,000	A	63	6,212	0,131	BC
	49	5,000	0,074	B	5,000	0,000	A	91	5,000	0,131	C
								120	5,000	0,131	C
								154	5,000	0,131	C
Lagarto	8	12,218	0,086	A	5,000	0,000	A	8	18,874	0,063	A
	15	6,691	0,086	B	5,000	0,000	A	35	6,878	0,063	B
	35	5,000	0,086	B	5,000	0,000	A	63	5,000	0,063	C
	49	5,000	0,086	B	5,000	0,000	A	91	5,000	0,063	C
								120	5,000	0,063	C
								154	5,000	0,063	C
Recortes	8	12,668	0,263	A	5,000	0,000	A	8	52,243	0,190	A
	15	10,253	0,118	A	5,000	0,000	A	35	11,605	0,085	B
	35	5,000	0,118	B	5,000	0,000	A	63	7,682	0,085	C
	49	5,000	0,118	B	5,000	0,000	A	91	6,179	0,085	CD
								120	5,000	0,085	D
								154	5,000	0,085	D
Contrafilé	8	20,504	0,076	A	5,000	0,000	A	8	49,048	0,049	A
	15	8,304	0,076	B	5,000	0,000	A	35	12,318	0,049	B
	35	5,000	0,076	C	5,000	0,000	A	63	5,092	0,049	C
	49	5,200	0,076	C	5,000	0,000	A	91	5,000	0,049	C
								120	5,000	0,049	C
								154	5,000	0,049	C
Fraldinha	8	31,992	0,103	A	5,000	0,000	A	8	63,586	0,082	A
	15	10,101	0,109	B	5,000	0,000	A	35	15,877	0,082	B
	35	5,000	0,103	C	5,000	0,000	A	63	5,466	0,082	C
	49	5,000	0,103	C	5,000	0,000	A	91	5,000	0,082	C
								120	5,000	0,082	C
								154	5,000	0,087	C

Tabela 8 - Estimativas de médias das concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e de longa ação (IVM-LA) e eprinomectina *pour on* (EPR-PO) (em ppb), nos tecidos avaliados ao longo dos dias após a aplicação de cada princípio ativo (continuação)

	Dias pós- abate	IVM-CO	EP	EPR-PO	EP	Dias pós- abate	IVM-LA	EP	
Sítio aplicação	8	1539,326	0,488	A 5,000	0,000	A 8	6555,109	0,274	A
	15	21,048	0,488	B 5,000	0,000	A 35	30,417	0,274	C
	35	13,179	0,488	B 5,000	0,000	A 63	20,287	0,274	C
	49	12,458	0,488	B 5,000	0,000	A 91	852,352	0,274	B
						120	25,008	0,274	C
						154	35,588	0,274	C
Lombinho	8	48,716	0,065	A 5,000	0,000	A 8	87,584	0,039	A
	15	13,639	0,068	B 5,000	0,000	A 35	17,477	0,039	B
	35	5,000	0,068	C 5,000	0,000	A 63	5,105	0,039	C
	49	5,000	0,065	C 5,000	0,000	A 91	5,000	0,039	C
						120	5,000	0,039	C
						154	5,000	0,042	C
Miolo pescoço	8	28,832	0,109	A 5,000	0,000	A 8	41,754	0,259	A
	15	11,499	0,109	B 5,000	0,000	A 35	8,777	0,259	BC
	35	5,000	0,109	C 5,000	0,000	A 63	14,589	0,259	B
	49	5,000	0,109	C 5,000	0,000	A 91	5,000	0,259	C
						120	5,000	0,259	C
						154	5,000	0,259	C
Ponta noix	8	29,955	0,057	A 5,000	0,000	A 8	86,869	0,056	A
	15	13,754	0,057	B 5,000	0,000	A 35	22,821	0,056	B
	35	5,000	0,057	C 5,000	0,000	A 63	8,821	0,056	C
	49	5,000	0,057	C 5,000	0,000	A 91	5,797	0,056	D
						120	5,000	0,056	D
						154	5,000	0,056	D
Tendões	8	7,676	0,048	A 5,000	0,000	A 8	11,121	0,057	A
	15	8,055	0,048	A 5,000	0,000	A 35	5,000	0,057	B
	35	5,000	0,048	B 5,000	0,000	A 63	5,000	0,057	B
	49	5,000	0,048	B 5,000	0,000	A 91	5,000	0,057	B
						120	5,000	0,057	B
						154	5,000	0,057	B
Pescoço	8	14,569	0,095	A 5,000	0,000	A 8	21,717	0,051	A
	15	8,276	0,095	B 5,000	0,000	A 35	6,973	0,051	B
	35	5,000	0,095	C 5,000	0,000	A 63	5,141	0,051	C
	49	5,000	0,095	C 5,000	0,000	A 91	5,000	0,051	C
						120	5,000	0,051	C
						154	5,000	0,051	C

Tabela 8 - Estimativas de médias das concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e de longa ação (IVM-LA) e eprinomectina *pour on* (EPR-PO) (em ppb), nos tecidos avaliados ao longo dos dias após a aplicação de cada princípio ativo (conclusão)

	Dias pós- abate	IVM-CO	EP		EPR-PO	EP	Dias pós- abate	IVM-LA	EP	
Capa pescoço	8	8,261	0,080	A	5,000	0,000	A 8	32,845	0,154	A
	15	5,846	0,080	B	5,000	0,000	A 35	9,823	0,154	B
	35	5,000	0,080	B	5,000	0,000	A 63	7,041	0,154	BC
	49	5,000	0,080	B	5,000	0,000	A 91	5,000	0,154	C
							120	5,000	0,154	C
							154	5,000	0,173	C
Bucho	8	-	-	-	-	-	8	-	-	
	15	5,148	0,013	A	5,000	0,000	A 35	5,000	0,000	A
	35	5,000	0,013	A	5,000	0,000	A 63	5,000	0,000	A
	49	5,000	0,013	A	5,000	0,000	A 91	5,000	0,000	A
							120	5,000	0,000	A
							154	5,000	0,000	A
Gordura	8	37,887	0,105	A	5,000	0,000	A 8	100,454	0,097	A
	15	12,706	0,105	B	5,000	0,000	A 35	22,021	0,097	B
	35	5,000	0,105	C	5,000	0,000	A 63	12,231	0,097	C
	49	5,000	0,105	C	5,000	0,000	A 91	5,293	0,097	D
							120	5,000	0,097	D
							154	5,000	0,097	D
Língua	8	37,326	0,089	A	5,000	0,000	A 8	86,904	0,067	A
	15	10,888	0,089	B	5,000	0,000	A 35	16,702	0,067	B
	35	5,000	0,089	C	5,000	0,000	A 63	6,664	0,067	C
	49	5,000	0,089	C	5,000	0,000	A 91	5,117	0,067	D
							120	5,308	0,067	CD
							154	5,000	0,067	D
Carne cabeça	8	17,388	0,102	A	5,000	0,000	A 8	37,140	0,032	A
	15	7,905	0,102	B	5,000	0,000	A 35	6,659	0,032	B
	35	5,000	0,102	C	5,000	0,000	A 63	5,000	0,032	C
	49	5,000	0,102	C	5,000	0,000	A 91	5,000	0,032	C
							120	5,000	0,032	C
							154	5,000	0,032	C
Fígado	8	249,336	0,112	A	-	-	8	-	-	
	15	39,726	0,112	B	8,650	0,061	A 35	102,463	0,104	A
	35	5,000	0,112	C	5,000	0,064	B 63	42,254	0,104	B
	49	5,000	0,118	C	5,000	0,068	B 91	19,125	0,104	C
							120	10,549	0,104	D
							154	6,113	0,116	E

EP (erro padrão da média).

Médias seguidas por uma mesma letra, em uma mesma coluna e dentro de cada princípio ativo avaliado, não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste *t* de Tukey.

Fonte: Própria autoria.

Como pode ser observado na Tabela 8, as concentrações de eprinomectina em escala original (EPR-PO) foram <5 ppb ao longo de todos os períodos e tecidos avaliados, caracterizando-se pela ausência de variação, com exceção do fígado, que apresentou concentração de 8,65 ppb na avaliação realizada 15 dias após a aplicação, atingindo <5 ppb já na avaliação de 35 após a aplicação do medicamento, ou seja, muito inferiores aos LMR impostos internacionalmente que variam de 1.000 a 2.000 ppb em fígado (CANADÁ, 2015; FAO/WHO, 2017). Jiang et al. (2005) encontraram resultados semelhantes em um estudo de depleção de eprinomectina aplicada de forma subcutânea em bovinos e verificaram que após 8 dias do tratamento, as concentrações em músculo, fígado, rim e gordura estavam abaixo dos limites recomendados internacionalmente.

Estes achados corroboram os de Alvinerie et al. (1999) que descrevem que a eprinomectina, por ser uma LM mais polar, ou seja, com menor associação à lipídios, resulta em meia-vida menor, comparativamente com outras LM. Danaher et al. (2006) relataram que resíduos de LM administradas via *pour on* são menos persistentes do que quando a droga é injetada de forma subcutânea. Este fato sugere que a utilização de eprinomectina não acarretaria em violação de nenhum dos limites internacionais, em qualquer tempo após o abate.

Na Figura 2 são apresentados de forma gráfica, os resultados das análises de regressão demonstrando o comportamento das concentrações de EPR-PO no fígado, ao longo dos dias após a aplicação do medicamento (carência).

Figura 2 - Concentração de eprinomectina *pour on* (EPR-PO) em escala transformada (LN_EPR-PO) em fígado, em função dos dias avaliados após a aplicação do princípio ativo (carência). Equação de Predição: $Y=2,9919-0,06771X+0,000806X^2$

Limite de detecção da legenda refere-se ao limite de quantificação da técnica analítica=5ppb.

Fonte: Própria autoria.

Os resultados demonstraram, portanto, que os níveis de eprinomectina encontrados foram abaixo de todos os limites máximos de resíduos (LMR), ao longo de todos os períodos e tecidos avaliados.

Ao contrário do que foi observado para a eprinomectina, o padrão de depleção foi diferenciado entre os tecidos para ambas as ivermectinas, o que pode ser facilmente identificado ao se examinar o comportamento das médias ao longo dos períodos de carência (Tabela 8).

Para IVM-CO, este efeito (variabilidade de concentrações em cada tipo de tecido) é mais evidente nos primeiros dias após a aplicação do medicamento. Conforme pode ser observado na Tabela 9, a partir do 35º dia, todos os tecidos atingem valores <5 ppb (limite de quantificação da técnica analítica), com exceção do sítio de aplicação. Já para IVM-LA, este efeito de elevada variabilidade é ainda mais pronunciado, tanto nos primeiros dias após a aplicação, quanto nos demais. Por exemplo, para os tecidos bucho e tendões, as concentrações atingem <5 ppb já a partir de 35 dias após a aplicação do medicamento, enquanto que para o tecido lagarto, só a partir do 63º dia; para o tecido ponta do noix somente a partir do 120º dia, assim como a gordura e os recortes. A língua, apenas alcança valores <5 ppb com 154 dias pós aplicação do medicamento e o fígado chega aos 154 dias pós aplicação ainda com 6,113 ppb.

Estes resultados corroboram os de Nunez et al. (2007), que estudaram a depleção de resíduos de ivermectina em tecidos de ovelhas e encontraram concentrações em torno de 281,7 ppb no fígado aos 1,5 dias, e após um período de 21 dias encontraram concentrações aproximadas de 0,6 ppb. Da mesma forma, Park et al. (1999) compararam duas formulações comerciais de ivermectina, em suínos e encontraram que as maiores concentrações foram detectadas no dia 7, porém depois do dia 35, as concentrações de resíduos já estavam todas abaixo do limite de quantificação do método analítico em todos os tecidos pesquisados, incluindo o fígado.

O sítio de aplicação dos animais tratados com IVM-LA, mesmo após 154 dias, se manteve com 35,588 ppb, valor que configura violação do LMR para países como Japão, China, Canadá, União Europeia e também para o *Codex* (CANADÁ, 2015; CHINA, 2002; FAO/WHO, 2017; JAPAN, 2007; EUROPEAN UNION, 2010a, UNIÃO EUROPEIA, 2014). No caso da IVM-CO, o sítio de aplicação mesmo após 35 dias se manteve com 13,179 ppb e com 49 dias 12,458 ppb, ou seja, apresentando valores acima de 10 ppb, o que configura violação de LMR em países como o Japão, China e Canadá (CANADÁ, 2015; CHINA, 2002; JAPAN, 2007).

Tabela 9 – Tempo em dias (em função dos dias avaliados neste experimento) que as concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO), ivermectina longa ação (IVM-LA) e eprinomectina (EPR-PO) levaram para apresentar concentrações inferiores ao limite de quantificação da técnica analítica (<5 ppb) após a aplicação dos medicamentos

Tecido com concentração <5ppb	Dias pós aplicação IVM-CO	Dias pós aplicação IVM-LA	Dias pós aplicação EPR-PO
Carne sangria	35	91	8
Coxão duro	35	91	8
Lagarto	35	63	8
Recortes	35	120	8
Contrafilé	35	91	8
Fraldinha	35	91	8
Sítio aplicação	49 *ainda com 12,458ppb	154 *ainda com 35,588 ppb	8
Lombinho	35	91	8
Miolo pescoço	35	91	8
Ponta noix	35	120	8
Tendões	35	35	8
Pescoço	35	91	8
Capa pescoço	35	91	8
Bucho	35	35	15
Gordura	35	120	8
Língua	35	154	8
Carne cabeça	35	63	8
Fígado	35	154 *ainda com 6,113	35

Fonte: Própria autoria.

Os resultados deste experimento, apesar de muito superiores aos encontrados por Iezzi et al. (2017), também demonstram que existem concentrações residuais de ivermectina no sítio de aplicação, mesmo depois de cumprido o período de carência definido pelo fabricante do medicamento. Esses autores detectaram valores entre 15 e 141 ppb no sítio de aplicação de novilhos tratados com a formulação de ivermectina longa ação de concentração de 3,15%, porém não encontraram resíduos, depois de passado o período de carência nos animais tratados com a ivermectina convencional de 1%. A detecção de concentrações de fármaco residual no local da injeção é muito variável e pode ser causada pela absorção errática do volume total administrado. As lesões que diferentes veículos podem produzir no local da

injeção podem contribuir para a persistência de proporções da dose na área envolvida (GEORGE; HEINRICH; DEXTER, 1995).

Os dados obtidos neste estudo confirmam que se respeitados os períodos de carência dos medicamentos, praticamente todos os tecidos estarão abaixo dos LMR estabelecidos internacionalmente, exceto pelo sítio de aplicação. Na prática, os locais de injeção não são facilmente identificáveis e não se pode presumir que eles sejam removidos da cadeia alimentar, muito pelo contrário, a produção de processados cárneos faz uso particularmente de cortes não nobres, sobretudo oriundos do quarto dianteiro bovino, que incluem incontestavelmente o pescoço e o sítio de aplicação de medicamentos veterinários. Ou seja, na indústria processadora, não há descarte dessa porção muscular e sim o seu aproveitamento em produtos cárneos cuja textura não é relevante. Desta forma, pecuaristas, mesmo tendo cumprido o período de carência dos medicamentos aplicados podem fornecer animais para abate com concentrações elevadas de resíduos em seus sítios de aplicação e estas carnes são aproveitadas para produção de cortes ou produtos cárneos processados. Quando essas mercadorias são avaliadas nas inspeções portuárias de países importadores, podem sofrer sanções e penalidades que evidenciam uma lacuna de esclarecimento no comércio internacional.

Conforme pôde ser notado na Tabela 8, as estimativas de médias e análises de variância (ANOVAs) revelaram efeito significativo ($P < 0,01$) para a interação tecido x dias após aplicação, tanto para IVM-CO, como para IVM-LA. Desta forma, utilizou-se análises de regressão, visando estudar o fator ‘dias após aplicação’ do princípio ativo, dentro de cada tecido e para cada concentração de ivermectina avaliada.

Nas Tabelas 10 e 11 e nas Figuras 3 a 19 são apresentados os resultados das análises de regressão demonstrando o comportamento das concentrações de IVM-CO e IVM-LA, respectivamente, ao longo dos dias após a aplicação, para cada tecido avaliado.

Tabela 10 - Estimativas dos interceptos (β_0), coeficientes de regressão (β_1 e β_2), respectivas probabilidades associadas às estimativas de β_i , para $i=1$ ou 2 , ponto de mínimo das funções ($X_{\min.}$), concentrações estimadas (em escala logarítmica e em escala original) para ivermectina convencional (IVM-CO) ao longo dos períodos pós aplicação, para cada tecido avaliado

Matriz	Ivermec- tina	Estimati- va de β_0	Estimati- va de β_1	Estimati- va de β_2	Pr > t	$X_{\min.}$	LN($\hat{Y}$)	$\hat{Y}_{\min.}$
Carne sangria	IVM-CO	3,6819	-0,1152	0,00151	<,0001	38,22	1,4803	4,39
Coxão duro	IVM-CO	3,4582	-0,1159	0,00163	<,0001	35,53	1,3992	4,05
Lagarto	IVM-CO	2,9683	-0,0772	0,00102	<,0001	37,71	1,5137	4,54
Recortes	IVM-CO	3,2252	-0,0758	0,00087	<,0001	43,57	1,5733	4,82
Contrafilé	IVM-CO	3,7804	-0,1227	0,00164	<,0001	37,50	1,4798	4,39
Fraldinha	IVM-CO	4,4445	-0,1558	0,00202	<,0001	38,53	1,4433	4,23
Sítio aplicação	IVM-CO	9,6842	-0,4467	0,00627	<,0001	35,62	1,7293	5,64
Lombinho	IVM-CO	5,1151	-0,1881	0,00240	<,0001	39,22	1,4264	4,16
Miolo pescoço	IVM-CO	4,2999	-0,1418	0,00179	<,0001	39,68	1,4869	4,42
Ponta noix	IVM-CO	4,3744	-0,1390	0,00169	<,0001	41,10	1,5180	4,56
Tendões	IVM-CO	2,1824	-0,0130		<,0001			
Pescoço	IVM-CO	3,2514	-0,0867	0,00109	<,0001	39,63	1,5329	4,63
Capa pescoço	IVM-CO	2,3724	-0,0436	0,00058	<,0001	37,55	1,5533	4,73
Bucho	IVM-CO	--			n.s			
Gordura	IVM-CO	3,2252	-0,0758	0,00087	<,0001	43,57	1,5733	4,82
Língua	IVM-CO	4,6790	-0,1691	0,00220	<,0001	38,47	1,4266	4,16
Carne cabeça	IVM-CO	3,5102	-0,1057	0,00138	<,0001	38,21	1,4906	4,44

Fonte: Própria autoria.

Tabela 11 - Estimativas dos interceptos (β_0), coeficientes de regressão (β_1 e β_2), respectivas probabilidades associadas às estimativas de β_i , para $i=1$ ou 2 , ponto de mínimo das funções ($X_{\min.}$), concentrações estimadas (em escala logarítmica e em escala original) para ivermectina longa ação (IVM-LA) ao longo dos períodos pós aplicação, para cada tecido avaliado

Matriz	Ivermec- tina	Estimati- va de β_0	Estimati- va de β_1	Estimati- va de β_2	Pr > t	$X_{\min.}$	LN($\hat{Y}$)	$\hat{Y}_{\min.}$
Carne sangria	IVM-LA	4,0017	-0,0474	0,00021	<,0001	111,24	1,3658	3,92
Coxão duro	IVM-LA	3,3733	-0,0333	0,00015	<,0001	114,14	1,4711	4,35
Lagarto	IVM-LA	3,0007	-0,0288	0,00013	<,0001	108,31	1,4405	4,22
Recortes	IVM-LA	3,6423	-0,0333	0,00013	<,0001	125,19	1,5579	4,75
Contrafilé	IVM-LA	4,1224	-0,0496	0,00022	<,0001	111,26	1,3621	3,90
Fraldinha	IVM-LA	4,4590	-0,0548	0,00024	<,0001	113,20	1,3578	3,89
Sítio aplicação	IVM-LA	8,1720	-0,0880	0,00038	<,0001	116,36	3,0538	21,20
Lombinho	IVM-LA	4,8062	-0,0626	0,00028	<,0001	111,75	1,3095	3,70
Miolo pescoço	IVM-LA	3,8771	-0,0398	0,00018	<,0001	109,34	1,7012	5,48
Ponta noix	IVM-LA	4,8167	-0,0541	0,00022	<,0001	123,00	1,4883	4,43
Tendões	IVM-LA	2,3801	-0,0172	0,00008	<,0001	104,70	1,4813	4,40
Pescoço	IVM-LA	3,1389	-0,0315	0,00015	<,0001	108,66	1,4270	4,17
Capa pescoço	IVM-LA	3,6398	-0,0373	0,00016	<,0001	115,96	1,4748	4,37
Bucho	IVM-LA				n.s			
Gordura	IVM-LA	3,6423	-0,0333	0,00013	<,0001	125,19	1,5579	4,75
Língua	IVM-LA	4,7445	-0,0583	0,00025	<,0001	115,14	1,3905	4,02
Carne cabeça	IVM-LA	3,6421	-0,04331	0,00020	<,0001	106,67	1,3321	3,79

Fonte: Própria autoria.

Como pode ser observado na Tabela 10, para o tecido tendões, o modelo linear de primeiro grau apresentou-se significativo quando considerada a IVM-CO. Para todos os demais tecidos, considerando tanto a IVM-CO (Tabela 10), quanto a IVM-LA (Tabela 11), foram significativas as estimativas dos coeficientes de regressão associadas ao modelo linear de segundo grau, com exceção do tecido bucho. Assim, é possível obter equações de predições das concentrações de ivermectina em função dos dias de carência, que podem ser úteis em programas de controle de resíduos nas indústrias de processamento de carne bovina, já que dependendo da concentração encontrada no tecido pode-se avaliar o tempo de carência aproximado praticado pelo pecuarista e com isso, aplicar ou não penalidades pelo não cumprimento às instruções do fabricante de medicamentos e também não cumprimento com os termos de comércio de animais.

Figura 3 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em carne de sangria, em função dos dias pós aplicação

Fonte: própria autoria.

Figura 4 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em coxão duro, em função dos dias pós aplicação

Fonte: Própria autoria.

Figura 5 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em lagarto, em função dos dias pós aplicação

Fonte: Própria autoria.

Figura 6 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em recortes, em função dos dias pós aplicação

Fonte: Própria autoria.

Figura 7 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em contrafilé, em função dos dias pós aplicação

Fonte: Própria autoria.

Figura 8 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em fraldinha, em função dos dias após a aplicação

Fonte: Própria autoria.

Figura 9 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em sítio de aplicação, em função dos dias após a aplicação

Fonte: Própria autoria.

Figura 10 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em lombinho, em função dos dias pós aplicação

Fonte: Própria autoria.

Figura 11 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em miolo do pescoço, em função dos dias pós aplicação

Fonte: Própria autoria.

Figura 12 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em ponta do nox, em função dos dias pós aplicação

Fonte: Própria autoria.

Figura 13 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em tendões, em função dos dias pós aplicação

Fonte: Própria autoria.

Figura 14 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em pescoço, em função dos dias pós aplicação

Fonte: Própria autoria.

Figura 15 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em capa do pescoço, em função dos dias pós aplicação

Fonte: Própria autoria.

Figura 16 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em bucho, em função dos dias pós aplicação

Fonte: Própria autoria.

Figura 17 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em gordura, em função dos dias pós aplicação

Fonte: Própria autoria.

Figura 18 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em língua, em função dos dias pós aplicação

Fonte: Própria autoria.

Figura 19 - Concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) em carne de cabeça, em função dos dias pós aplicação

Fonte: Própria autoria.

6.2 Estimativas de correlação de resíduos de ivermectina entre fígado e músculo

As concentrações de cinco tecidos foram avaliadas em relação às concentrações observadas no fígado: carne de sangria, recortes, coxão duro, lagarto e contrafilé.

A carne de sangria (constituída pelo grupo muscular do pescoço, atingido pela ferida de sangria) e os recortes (aparas do refile de cortes) foram escolhidos porque ambos são matérias primas utilizadas para composição da maioria dos produtos industrializados (termo processados), comercializados tanto no mercado interno, quanto destinados à exportação.

O coxão duro (músculo bíceps femoral) e o lagarto (músculo semi tendinoso) são as matérias primas, frequentemente utilizadas para produção de *beef jerky*, produto apreciado pelo mercado norte americano e bastante exportado pelo Brasil.

O corte conhecido como contrafilé ou *Longissimus lumborum* foi testado neste experimento por ser considerado um corte nobre do traseiro, bastante comercializado para mercados internacionais e, além disso, é utilizado em experimentos científicos para possibilitar a comparação de resultados entre as pesquisas.

O fato de a eprinomectina não exibir variação nos tecidos (exceto fígado), contendo-se ao limite inferior de quantificação da técnica <5 ppb, inviabiliza os estudos de relacionamento entre as concentrações de eprinomectina nos diferentes tecidos avaliados. Já para IVM-CO e IVM-LA a dispersão ocorrida em todos os tecidos avaliados possibilitou o estudo de correlações.

As estimativas de análises de correlações entre os tecidos para IVM-CO avaliada em escala transformada (LN_IVM-CO) são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Estimativas de correlações momento-produto de Pearson para a variável concentração de ivermectina convencional (IVM-CO) e ivermectina longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA)

		Fígado	Carne sangria	Coxão duro	Lagarto	Recortes	Contrafilé
IVM-CO							
Fígado		1,00000	0,74587	0,81175	0,77160	0,92314	0,91096
	H ₀ : Rho=0		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	N	40	40	40	40	40	40
Carne Sangria		0,74587	1,00000	0,87936	0,92022	0,81600	0,81610
	H ₀ : Rho=0	<.0001		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	N	40	40	40	40	40	40
Coxão duro		0,81175	0,87936	1,00000	0,89832	0,89237	0,89925
	H ₀ : Rho=0	<.0001	<.0001		<.0001	<.0001	<.0001
	N	40	40	40	40	40	40
Lagarto		0,77160	0,92022	0,89832	1,00000	0,87399	0,82391
	H ₀ : Rho=0	<.0001	<.0001	<.0001		<.0001	<.0001
	N	40	40	40	40	40	40
Recortes		0,92314	0,81600	0,89237	0,87399	1,00000	0,90277
	H ₀ : Rho=0	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		<.0001
	N	40	40	40	40	40	40
Contrafilé		0,91096	0,81610	0,89925	0,82391	0,90277	1,00000
	H ₀ : Rho=0	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
	N	40	40	40	40	40	40
IVM-LA							
Fígado		1,00000	0,67863	0,61621	0,47920	0,73333	0,63555
	H ₀ : Rho=0		<.0001	<.0001	0,00060	<.0001	<.0001
	N	48	48	48	48	48	48
Carne Sangria		0,67863	1,00000	0,87122	0,94764	0,94299	0,96285
	H ₀ : Rho=0	<.0001		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	N	48	60	60	60	60	60
Coxão duro		0,61621	0,87122	1,00000	0,78209	0,82122	0,83966
	H ₀ : Rho=0	<.0001	<.0001		<.0001	<.0001	<.0001
	N	48	60	60	60	60	60
Lagarto		0,47920	0,94764	0,78209	1,00000	0,87916	0,90119
	H ₀ : Rho=0	0,00060	<.0001	<.0001		<.0001	<.0001
	N	48	60	60	60	60	60
Recortes		0,73333	0,94299	0,82122	0,87916	1,00000	0,93547
	H ₀ : Rho=0	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		<.0001
	N	48	60	60	60	60	60
Contrafilé		0,63555	0,96285	0,83966	0,90119	0,93547	1,00000
	H ₀ : Rho=0	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
	N	48	60	60	40	60	60

N (número de amostras)

Fonte: Própria autoria.

Como podem ser observadas na Tabela 12, as estimativas de correlações foram todas positivas e significativas ($P < 0,01$), indicando que as concentrações são proporcionais, ou seja, quanto mais elevadas as concentrações de ivermectina no fígado, maiores também serão

esperadas nas demais matrizes testadas (carne de sangria, coxão duro, lagarto, recortes e contrafilé).

Para IVM-CO, as correlações entre o fígado e demais tecidos foram mais relevantes do que para IVM-LA, oscilando de 0,74587 a 0,92314 (carne de sangria e recortes, respectivamente) e entre 0,4792 a 0,7333 (lagarto e recortes, respectivamente) para IVM-LA.

Este fato de ter estimativas de correlações ligeiramente inferiores para IVM-LA pode estar relacionado ao fato de haver uma dispersão maior entre os dados ao longo dos períodos de coleta e análise, pós-aplicação deste medicamento.

Para fins de melhor entendimento das relações existentes entre as concentrações dos tecidos (carne de sangria, coxão duro, lagarto, recortes e contrafilé), em relação às concentrações observadas no fígado, foram realizadas análises de regressão utilizando-se as concentrações dos tecidos musculares como variáveis dependentes e as concentrações no fígado como variável independente.

Na Tabela 13 e nas Figuras 20 e 21 são apresentados os resultados das análises de regressão demonstrando o comportamento das concentrações de IVM-CO e IVM-LA, respectivamente, dos tecidos musculares em função das concentrações do princípio ativo no fígado.

Tabela 13 - Estimativas dos interceptos (β_0), coeficiente de regressão (β_1), valores de probabilidades ($H_0: \beta_1=0$) e coeficientes de determinação (R^2) para concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) e ivermectina longa ação (IVM-LA) em escala transformada (LN_IVM-CO e LN_IVM-LA) dos tecidos musculares em função das concentrações do princípio ativo no fígado

Tipo de ivermectina	Tecido avaliado	Equação de predição	Pr > t ($H_0: \beta_1=0$)	R²
LN_IVM-CO	Carne sangria	$Y=1,10454+0,28568X_{LN}$	<,0001	0,5563
	Coxão duro	$Y=1,15043+0,23624X_{LN}$	<,0001	0,6589
	Lagarto	$Y=1,29921+0,17863X_{LN}$	<,0001	0,5954
	Recortes	$Y=0,96411+0,37991X_{LN}$	<,0001	0,8522
	Contrafilé	$Y=1,11794+0,28894X_{LN}$	<,0001	0,8298
LN_IVM-LA	Carne sangria	$Y=1,1826+0,19475X_{LN}$	<,0001	0,4605
	Coxão duro	$Y=1,09728+0,21931X_{LN}$	<,0001	0,3797
	Lagarto	$Y=1,43919+0,07715X_{LN}$	<,0001	0,2296
	Recortes	$Y=1,12031+0,26016X_{LN}$	<,0001	0,5378
	Contrafilé	$Y=1,14773+0,21297X_{LN}$	<,0001	0,4039

Fonte: Própria autoria.

Observa-se que, pela Tabela 13, todos os coeficientes de regressão (β_1) foram significativamente diferentes de zero.

Para IVM-CO, o aumento de 1 unidade (em escala LN) observada no fígado, chegam aos tecidos carne de sangria, coxão duro, lagarto, recortes e contrafilé apenas 0,28568, 0,23624, 0,17863, 0,37991 e 0,28894 unidades, respectivamente, em escala LN. O mesmo fato ocorre para IVM-LA, para cada aumento de 1 unidade (em escala LN) observada no fígado, chegam aos tecidos carne de sangria, coxão duro, lagarto, recortes e contrafilé 0,19475, 0,21931, 0,07715, 0,26016 e 0,21297 unidades em escala LN respectivamente.

Na Tabela 13 também pode ser verificado que as funções associadas à IVM-LA tiveram pior qualidade de ajuste evidenciado pelos menores valores de R^2 .

As Figuras 20 e 21 demonstram, respectivamente, o comportamento das concentrações de IVM-CO e IVM-LA dos tecidos musculares em função das concentrações do princípio ativo no fígado.

Figura 20 - Comportamento das concentrações de ivermectina convencional (IVM-CO) nos tecidos musculares (carne de sangria, coxão duro, lagarto, recortes e contrafilé), em função das concentrações do princípio ativo no fígado

Fonte: Própria autoria.

Figura 21 - Comportamento das concentrações de ivermectina longa ação (IVM-LA) nos tecidos musculares (carne de sangria, coxão duro, lagarto, recortes e contrafilé), em função das concentrações do princípio ativo no fígado

Fonte: Própria autoria.

A aplicação das equações apresentadas, pode ser feita para testar qual concentração seria obtida em determinado tecido, baseando-se nos resultados de outro e dessa forma, verificar sua conformidade com os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos.

Utilizando-se a equação obtida para IVM-CO, por exemplo, um resultado de concentração de 100 ppb no fígado ($LN=4,6052$), apresentaria o equivalente a 11,57 ppb no contrafilé ($LN=2,5586$) e 15,08 ppb em recortes ($LN=2,7137$).

Esta ferramenta pode ser muito útil nos programas de controle de resíduos de rotina em uma indústria de produção de carne bovina.

Com essa mesma intenção, Yang et al. (2010) buscaram encontrar correlação entre o marcador AOZ (da furazolidona) em plasma, com os tecidos fígado, urina e rim, já que se trata de uma substância proibida, mas ainda usada clandestinamente. Segundo esses autores, as boas correlações encontradas fornecem embasamento para uma forma simples e econômica de se monitorar o uso ilegal de furazolidona em suínos.

6.3 Comportamento dos resíduos de ivermectina em produtos cárneos enlatados termicamente processados

Em razão dos resultados de concentração de eprinomectina, obtidos a partir da análise dos tecidos de bovinos submetidos a diferentes períodos de carência (8, 15, 35, 49, 63, 91, 120 e 154 dias pós-aplicação) terem sido todos abaixo do limite de quantificação do método, não configurando portanto, um potencial problema de resíduos que pudessem extrapolar os limites estabelecidos, o experimento com a avaliação de produtos cárneos enlatados termicamente processados foi conduzido apenas com matéria prima com concentrações conhecidas de ivermectina.

Verificou-se a estabilidade de concentrações conhecidas de ivermectina em carne enlatada esterilizada comercialmente. Os tecidos avaliados carne de cabeça, miolo do pescoço, carne de sangria e tendões, são os que habitualmente são utilizados nas formulações de produtos cárneos processados termicamente, como almondegas, fiambres, salsichas, especialmente o *corned beef*, uma conserva de carne tradicional, bastante popular, amplamente exportada pelo Brasil, que utiliza a salga e a cura, além da esterilização, para a sua conservação.

As concentrações iniciais de ivermectina presentes no produto antes do processamento térmico foram obtidas do experimento anterior (Tabela 12) para avaliar a distribuição de resíduos de ivermectina em diferentes tecidos bovinos e o processamento térmico usado foi a esterilização convencional aplicada a produtos enlatados como é o caso do *corned beef*, *cubed beef*, carne com molho, etc. (temperatura de 125°C por 65 minutos).

Os resumos das análises de variância (ANOVAS) para a variável concentração de ivermectina antes e após o processamento térmico são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Resumo das análises de variância para a variável concentração de ivermectina antes e após o processamento térmico

	G.L. Num	G.L. Den.	Valor F	Pr > F
Carne de cabeça	1	4	214,4	<,0001
Miolo do pescoço	1	4	9,17	0,0389
Carne sangria	1	4	42,68	0,0028
Tendões	1	4	4	0,1161

G.L.Num=Graus de Liberdade do Numerador do Teste F; G.L.Den=Graus de Liberdade do Denominador do Teste F (erro experimental).

Fonte: Própria autoria.

As estimativas de médias e o erro padrão (EP) para os tecidos carne de cabeça, miolo do pescoço, carne de sangria e tendões, antes e após processamento térmico, encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15 - Estimativas de médias de concentração de ivermectina (em ppb) dos tecidos carne de cabeça, miolo do pescoço, carne de sangria e tendões para as variáveis antes e após processamento térmico

	VARIÁVEL	MÉDIA	EP	
Carne de cabeça	PRÉ-ESTERILIZAÇÃO	10,2800	0,8064	B
	PÓS-ESTERILIZAÇÃO	26,2667	0,7361	A
Miolo do pescoço	PRÉ-ESTERILIZAÇÃO	11,3200	26,1351	B
	PÓS-ESTERILIZAÇÃO	118,4500	23,8580	A
Carne sangria	PRÉ-ESTERILIZAÇÃO	5,4600	1,0615	B
	PÓS-ESTERILIZAÇÃO	14,8500	0,9690	A
Tendões	PRÉ-ESTERILIZAÇÃO	18,6000	2,8614	A
	PÓS-ESTERILIZAÇÃO	10,8500	2,6121	A

EP (Erro Padrão)

Médias seguidas por uma mesma letra, em uma mesma coluna e dentro de cada princípio ativo avaliado, não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste *t* de Tukey.

Fonte: Própria autoria.

Como pode ser observado pela Tabela 15, não houve diferença estatística com relação à concentração de ivermectina antes e após o processo térmico para a matéria prima tendões, corroborando os resultados de Cooper et al. (2011) em carne e fígado bovinos assados ou

fritos; os de Imperiale et al. (2009) em leite de ovelha pasteurizado e os de Rose, Farrington e Shearer (1998) em diferentes tecidos de animais submetidos a micro-ondas, fritura e fervura.

Porém, para carne de sangria, carne de cabeça e miolo do pescoço, os resultados de concentrações de resíduos foram significativamente mais elevados após o processamento térmico ($P < 0,05$). Não foram encontrados na literatura trabalhos como este que avaliou o efeito da esterilização por autoclaves na estabilidade de resíduos de ivermectina, em um ambiente hermeticamente fechado. No caso dos enlatados, como não há escoamento de fluidos exsudados, as moléculas de ivermectina permanecem em contato com o produto durante todo o processo e constatou-se que o efeito da temperatura não reduz e pode até gerar resultados de aumento de concentração de ivermectina no produto final. Uma possível explicação para esse fato, pode ser devido à conversão de metabólitos não identificados em moléculas como as do marcador específico de resíduos de ivermectina, assim como foi discutido por Cooper et al. (2011).

Portanto, os níveis de resíduos de medicamentos detectados em músculos de carne bovina crua não podem ser diretamente aplicáveis para estimar a exposição do consumidor final aos resíduos em carnes enlatadas submetidas a processamento térmico, já que nestes casos, há que se considerar o uso de diferentes tipos de cortes bovinos, com diferentes proporções de gordura e com chance elevada da presença do sítio de injeção ser misturado à massa (região do pescoço).

Implicações do estudo: níveis de resíduos de medicamentos detectados em músculos de carne bovina crua não se mostram diretamente aplicáveis para estimar as concentrações em produtos cárneos enlatados. A compreensão dos efeitos do tratamento térmico sobre as concentrações de resíduos de medicamentos em carne bovina ainda precisa ser ampliada.

7 CONCLUSÕES

As dinâmicas de depleção de ivermectina e eprinomectina em tecidos comestíveis bovinos são distintas entre si e a eprinomectina é mais recomendada que a ivermectina, no que tange ao propósito de se evitar violações de LMR.

Os achados deste experimento refletem padrões distintos de distribuição de resíduos em cada tecido avaliado e confirmam que se respeitados os períodos de carência dos medicamentos, praticamente todos os tecidos estarão abaixo dos LMR estabelecidos internacionalmente, exceto pelo sítio de aplicação, portanto, que o tempo de depleção de resíduos do sítio de aplicação (até abaixo do LMR) deveria ser considerado para a determinação do período de carência dos medicamentos; e que é fundamental haver uma harmonização dos LMR em esfera global para que barreiras técnico-comerciais não prejudiquem países que exportam para múltiplos destinos.

O processamento térmico a que os enlatados são submetidos provoca alterações nos níveis de resíduos quantificados, em relação aos produtos crus e isso deve ser levado em consideração nas análises de vigilância, pois pode gerar incertezas quanto à possibilidade de violação em mercados importadores.

A partir das correlações significativas encontradas entre concentrações residuais em fígado e em tecidos musculares, as equações obtidas podem ser usadas para se estimar a concentração de determinado tecido, baseando-se nos resultados de fígado e dessa forma, serem úteis em programas de vigilância.

REFERÊNCIAS

- ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Perfil da Pecuária no Brasil: Relatório Anual 2017. São Paulo: [s.l.], 2017. 48 p. Disponível em: <<http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2018.
- ABJEAN, J. P.; GAUGAIN, M. Planar chromatography for screening of ivermectin residues in swine and cattle tissues. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 78, n. 5, p. 1141-1144, 1995.
- AGÊNCIA ESTADO. **Exportação perde US\$ 104 mi por causa da ivermectina na carne**. 2011. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2011/11/exportacao-perde-us-104-mi-por-causa-da-ivermectina-na-carne.html>>. Acesso em: 18 jul. 2015.
- ALVINERIE, M.; GALTIER, P. Pharmacology and toxicology of antiparasitic drugs in animal husbandry. **Deuxiemes recontres autour des recherché sur les ruminants**, Paris, p. 259-263, 1995.
- ALVINERIE, M. et al. Persistence of ivermectin in plasma and faeces following administration of sustained-release bolus to cattle. **Research in Veterinary Science**, London, v. 66, n. 1, p. 57-61, 1999.
- AUSTRALIAN GOVERNMENT (Autralian). Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. **Agricultural and veterinary chemicals code instrument nº 4 (MRL Standard)** 2012. Disponível em: <<https://www.comlaw.gov.au/Details/F2015C00504/Download>> Acesso em 18 jul. 2015.
- BAGGOT, J. D.; BROWN, S. A. Basis for selection of dosage form. In: EDSHARDEE, G. E.; BAGGOT, J. D. (Ed.). **Development and formulation of veterinary dosage forms**. NewYork: Marcel Dekker Inc, 1998. p. 7-143.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006.
- 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.
- BENNEMA, S. C. et al. Epidemiology and risk factors for exposure to gastrointestinal nematodes in dairy herds in northwestern Europe. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 173, p. 247-254, 2010.
- BOGAN, J. A.; MCKELLAR, Q. A. The pharmacodynamics of ivermectina in sheep and cattle. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 11, p. 260-268, 1988.

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. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 6, de 27 de março de 2015. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 mar. 2015. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 13, de 29 de maio de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 maio 2014. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 48, de 28 dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 dez. 2011. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Circular nº 008/2010/CHC/CGPE/DIPOA** Suspensão da produção e certificação de matérias-primas e produtos à base de carnes exportáveis para os EUA. Brasília, 2010a.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Ofício Circular nº 045/2010/DIPOA** Estados Unidos. Revogação da suspensão a exportação de produtos termoprocessados destinados aos Estados Unidos - informações adicionais. Adita o Ofício Circular 044/2010/DIPOA. Brasília, 2010b.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Memo nº 745/2010/DIPOA** Japão. Exportações. Carne bovina termoprocessada. Ivermectina. Brasília, 2010c.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Ofício Circular nº 036/2010/DIPOA** Japão. Exportações. Carne termoprocessada. Ivermectina. Brasília, 2010d.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Circular nº 139/2010/CHC/CGPE/DIPOA** Análises de ivermectina em produto final. Brasília, 2010e.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Circular nº 016/2010/DIPOA** Certificação Revisão e revalidação dos planos APPCC. Brasília, 2010f.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Circular nº 018/2010/DIPOA** Certificação Critérios a serem utilizados durante as auditorias para avaliação da revisão e revalidação dos planos APPCC. Aditamento da Circular Nº 017/2010/DIPOA. Brasília, 2010g.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Ofício Circular nº 022/2010/DIPOA** Programa oficial de análise de avermectinas. Brasília, 2010h.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Circular nº 196/2010/CHC/CGPE/DIPOA** Diretrizes para verificação pelo Serviço Oficial do programa de rastreabilidade de matérias primas utilizadas na produção de carne bovina termoprocessada exportada para os Estados Unidos e Canadá. Brasília, 2010i.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Circular Nº 198/2010/CHC/CGPE/DIPOA** Análises de ivermectina em produto final. Aditamento a Circular Nº 139/2010/CHC/CGPE/DIPOA. Brasília, 2010j.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 42, de 20 de dezembro de 1999, **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 dez. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Relação de estabelecimentos**. Disponível em: <
http://bi.agricultura.gov.br/reports/rwservlet?sigsif_cons&estabelecimentos.rdf&p_id_area=1&p_id_cat_estab=73&p_id_classe_estab=&p_cd_classe_estab=&p_sg_uf=&p_id_municipio=&p_serial=1034863499¶mform=no> Acesso em: 04 fev. 2018.

BROWN, S. A. Challenges in development of sustained release parenteral formulations. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 23, suppl. 1, Q1, 2000.

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. et al. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. **Science**, New York, v. 221, p. 823-828, 1983.

CANADÁ. Canada Health. **List of Maximum Residue Limits (MRLs) for veterinary drugs in foods**. 2015. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/pdf/vet/mrl-lmr/mrl-lmr_versus_new-nouveau-feb2015-eng.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2015.

CERKVENIK, V. et al. Thermal and long-term freezing stability of ivermectin residues in sheep milk. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 213, n. 1, p. 72-76, 2001.

CHABALA, J. C. et al. Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent. **Journal Medicine and Chemistry**, Washington, v. 23, p. 1134-1136, 1980.

CHINA. Ministry of Agriculture of People's Republic of China. **Announcement nº 235 MRLs of veterinary drugs in animal derived food**. 2002. Disponível em: <<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/9d445f3c-91b4-4565-9782-c49cbd780e17/China-Announcement-235.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 11 nov. 2017.

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.

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

COCHRAN, W. G.; COX, M. G. **Experimental designs**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1967.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS. Tolerances for residues of new animal drugs in food. In: _____. **Food and drug administration**. 2017. part. 556. Disponível em: <<https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2017-title21-vol6/xml/CFR-2017-title21-vol6-part556.xml>> Acesso em: 11 nov. 2017.

COOPER, K. M. et al. Anthelmintic drug residues in beef: UPLC-MS/MS method validation, European retail beef survey, and associated exposure and risk assessments. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 29, n. 5, p. 746-760, 2012.

COOPER, K. M. et al. Stability during cooking of anthelmintic veterinary drug residues in beef. **Food Additives and Contaminants**, Part A Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, London, v. 28, n. 2 p. 155-165, 2011.

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.

CROOKS, S. R. H. et al. Detection of ivermectin residues in bovine liver using an enzyme immunoassay. **Analyst**, London, v. 123, n. 2, p. 355-358. 1998.

CROOP, T. A.; WILSON, D. J.; REYNOLDS, K. A. Identification of a cyclohexylcarbonyl CoA biosynthetic gene cluster and application in the production of doramectin. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 980-983, 2000.

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.

DAVIES, L.; O'CONNOR, M.; LOGAN, S. Chronic intake. In: HAMILTON, D.; CROSSLEY, S. (Ed.). **Pesticide residues in food and drinking water: human exposure and risks**. Chichester: John Wiley & Son, 2003. p. 213-241.

EUROPEAN UNION. **Regulation (EC) N° 396/2005** of European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. Official Journal of European Union, L.70, p. 1-16, Mar. 2005.

EUROPEAN UNION. **Regulation (EU) N° 37/2010** of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin Official Journal of European Community, L 15, p. 1-72, Jan. 2010a.

EUROPEAN UNION. **The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report**, 2010b. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/rasff_annual_report_2010_en.pdf> Acesso em: 18 jul. 2015.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMA. **European public MRL Assessment report (EPMAR): Ivermectin** (All mammalian food producing species). Committee for Medicinal Products for Veterinary Use EMA/CVMP/294840/2014, 2014. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_Report/2014/05/WC500167329.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2017.

EGERTON, J. R. et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: efficacy of the Bla component. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 15, p. 372-378, 1979.

ESCRIBANO, M. et al. Ivermectin residue depletion in food producing species and its presence in animal foodstuffs with a view to human safety. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Hilversum, n. 13, p. 987-998, 2012.

FAO/WHO. *Codex Alimentarius* Commission. **Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (rmrs) for residues of veterinary drugs in foods**. (40th Session of the *Codex Alimentarius* Commission). 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-whocodexalimentarius/shproxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcode%252Fstandards%252FCAC%2BMRL%2B2%252FMRL2e.pdf>> Acesso em: 11 nov. 2017.

FAO/WHO. World Health Organization. **“Ivermectin” Residue Monograph**. (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) meeting, 81., p. 1-36, 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/documents/card/en/c/488fd1d4-70e1-4369-a6af-fd1bcd234470/>>. Acesso em: 11 nov. 2017.

FAO/WHO. WHO expert committee on food additives. **Evaluation of certain veterinary drug residues in food**: fortieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (WHO Technical Report Series, 832). 1993. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/127845/1/9789241209885_eng.pdf> Acesso em 11 nov. 2017.

FAO/WHO. World Health Organization. **Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food**. (Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 36.). (WHO Additives Series, v. 27, p. 227, 1991).

FISHER, M. H.; MROZIK, H. Chemistry. In: CAMPBELL, W. (Ed.). **Ivermectin and abamectin**. New York: Springer, 1989. p. 1-23.

FISHER, M. H.; MROZIK, H. The chemistry and pharmacology of avermectins. **Annual review of pharmacology and toxicology**, Palo Alto, v. 32, p. 537-553, 1992.

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.

GRIMALT, S. et al. Evaluation of different quantitative approaches for the determination of noneasily ionizable molecules by different atmospheric pressure interfaces used in liquid chromatography tandem mass spectrometry: Abamectin as case of study. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 16, n. 10, p. 1619-1630, 2005.

HE, L. M. et al. Determination of macrocyclic lactone drug residues in animal muscle by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 92, n. 1, p. 348-358, 2009.

HEBERT, M.F. Contributions of hepatic and intestinal metabolism and Pglycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 27, p. 201-214, 1997.

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

HERNANDO, M. D. et al. Fast separation liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the confirmation and quantitative analysis of avermectin residues in food. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1155, n. 1, p. 62-73, 2007.

HOU, X. L. et al. Multiresidue analysis of avermectins in cattle liver by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 89, n. 4, p. 1110-1115, 2006.

IEZZI, S. et al. Relationship between ivermectin concentrations at the injection site, muscle and fat of steers treated with traditional and long-acting preparations. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 105, p. 319-321, 2017.

IMPERIALE, F. A. et al. Thermal stability of antiparasitic macrocyclic lactones milk residues during industrial processing. **Food Additives and Contaminants**, Part A Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, London, v. 26, n. 1, p. 57-62, 2009.

INOUE, K. et al. Simultaneous determination of avermectins in bovine tissues by LC-MS/MS. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 32, n. 21, p. 3596-3602, 2009.

JAPAN. Ministry of Health. Labour and Welfare of Japan. **General compositional standards for food**, Part I Food: The maximum residue limits of substances used as ingredients of agricultural chemicals in foods (MRLs List) and (Provisional MRLs List), 2007. Disponível em:

<<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/positivelist060228/dl/index-1a.pdf>>.<<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/positivelist060228/dl/index-1b.pdf>>. Acesso em: 18 jul. 2015.

JIANG, H. et al. Residue depletion of eprinomectin in bovine tissues after subcutaneous administration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 23, p. 9288-92, 2005.

KINSELLA, B. et al. New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography - tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 637, n. 1-2, p. 196-207, 2009.

KITA, K.; SHIOMI, K.; OMURA, S. Advances in drug discovery and biochemical studies. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 223-229, 2007.

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

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

LIFSCHITZ, A. et al. Ivermectin disposition 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.

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

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

MEALEY, K. L. et al. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. **Pharmacogenetics**, London, v. 11, n. 8, p. 727-733, 2001.

MOLINARI, G. et al. *In vitro* genotoxic and cytotoxic effects of ivermectin and its formulation ivomec on Chinese hamster ovary (CHOKI) cells. **Journal Hazard Mater**, Amsterdam, v. 165, p. 1074-1082, 2009.

MOLINARI, G.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. New ventures in the genotoxic and cytotoxic effects of macrocyclic lactones, abamectin and ivermectin. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 128, p. 37-45, 2010.

MOREIRA, A. S. Effect of heat treatment on stability of ivermectin: preliminary results. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HORMONE AND VETERINARY DRUG RESIDUE ANALYSIS, 3., 1998, Bruges. **Proceedings...** Bruges: Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Ghent, 1998. p. 64.

MUSHTAQ, M. et al. Immobility of Emamectin Benzoate in Soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, p. 940-944, 1996.

NORDLANDER, I.; JOHNSON, H. Determination of ivermectin residues in swine tissues: An improved clean-up procedure using solidphase extraction. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 7, n. 1, p. 79-82, 1990.

NUNEZ, M. J. et al. Validación de un método analítico y determinación de residuos de ivermectina en tejidos de ovino. **Revista Científica**, Maracaibo, v. 17, n. 6, p. 557-565, 2007.

ONG, S.; LIU, H.; PIDGEON, C. Immobilized-artificial-membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 728, p. 113-128, 1996.

PARK, K. M. et al. Pharmacokinetics and tissue residues of ivermectin in swine. **Korean Journal of Veterinary Research**, Seoul, v. 39, n. 2, p. 257-266, 1999.

PRATA, C. B. **Aspectos do autocontrole de resíduos de avermectinas no abate de bovinos**. 2014. 62 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

RATH, S. et al. Avermectinas no agronegócio brasileiro: Uma solução ou um problema. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 23, n. 1, p. 8-24, 2016.

RASMUSSEN, F. Tissue damage at the injection site after intramuscular injection of drugs in food-producing animals. In: FRENS, J.; VAN DER KREEK, F.W. (Ed.). **Trends in veterinary pharmacology and toxicology: developments in animal and veterinary sciences**. Amsterdam: Elsevier, 1980. p. 27-33.

REEVES, P. T. The safety assessment of chemical residues in animal-derived foods. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 83, n. 3, p. 151-153, 2005.

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

ROSE, M. D. et al. The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 2. Levamisole. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 2, p. 185-194, 1995.

ROSE, M. D.; SHEARER, G.; FARRINGTON, W. H. The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 5. Oxfendazole. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 14, n. 1, p. 15-26, 1997.

ROSE, M. D.; FARRINGTON, W. H. H.; SHEARER, G. The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 7. Ivermectin. **Food Additives and Contaminants**, London, n. 15, v. 2, p. 157-161, 1998.

RUBENSAM, G. et al. 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**, Guildford, v. 29, p. 55-60, 2013.

RUBENSAM, G. **Determinação dos resíduos de avermectinas e milbemicinas em leite bovino por cromatografia líquida e detecção por fluorescência e espectrometria de massas**. 2010. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

RUBERY, E. D.; BARLOW, S. M.; STEADMAN, J. H. Criteria for setting quantitative estimates of acceptable intakes of chemicals in food in the UK. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 7, n. 3, p. 287-302, 1990.

SAEGERMAN, C. et al. On-farm contamination of animals with chemical contaminants. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 25, n. 2, p. 655-673, 2006.

SAMSONOVA, J. V. et al. Determination of ivermectin in bovine liver by optical immunobiosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, Oxford, v. 17, n. 6-7, p. 523-529, 2002.

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.

SAS Institute Inc. SAS OnlineDoc, v. 9.4, Cary, NC: SAS Institute Inc. Disponível em: <<http://support.sas.com/documentation/94/>>. Acesso em: 10 dez. 2017.

SCHENCK, F. J.; BARKER, S. A.; LONG, A. R. Matrix solid-phase dispersion extraction and liquid chromatographic determination of ivermectin in bovine liver tissue. Drug residues in animal tissue. **Journal of AOAC International**. Arlington, v. 75, n. 4, p. 655-658, 1992.

SCHINKEL, A. H. et al. Disruption of the mouse mdrla P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to an increased sensitivity to drugs. **Cell**, Cambridge, v. 77, n. 4, p. 491-502, 1994.

SCHMIDT, D. J. et al. Monoclonal antibodies for immunoassay of avermectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 8, p. 1763-1770, 1990.

SHI, W. M. et al. Determination of multiresidue of avermectins in bovine liver by an indirect competitive ELISA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 17, p. 6143-614, 2006.

SHOOP, W. L. et al. Eprinomectin: a novel avermectin for use as a topical endectocide for cattle. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, n.11, p. 1237-1242, 1996.

SLANINA, P. et al. Ivermectin residues in the edible tissues of swine and cattle - Effect of cooking and toxicological evaluation. **Food Additives and Contaminants**, Part A, chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, Abingdon, n. 6, v. 4, p. 475-481, 1989.

SOLECKI, R. et al. Guidance on setting of acute reference dose (ARfD) for pesticides. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 43, n. 1569, 2005.

TAKAHASHI, Y. et al. *Streptomyces avermectinius* sp avermectin-producing strain. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, London, v. 52, p. 2163-2168, 2002.

THIEBAUT, F., TSURUO, T., HAMADA, H., GOTTESMAN, M.M., PASTAN, I., WILLINGHAM, M.C. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. **National. Academy Science**, v. 84, p. 7735-7738, 1987.

TURNIPSEED, S. B. et al. Analysis of avermectin and moxidectin residues in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using an atmospheric pressure chemical ionization/atmospheric pressure photoionization source. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 529, n. 1-2, p. 159-165, 2005.

UNIÃO EUROPEIA. **Diretiva 2004/28/CE** do Parlamento Europeu e do Conselho de 31 de março de 2004 que altera a Diretiva 2001/82/CE que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos veterinários. Jornal Oficial da União Europeia, L 311, p. 1-66. Abr. 2004.

UNIÃO EUROPEIA. **Regulamento de Execução (UE) N° 418/2014** da Comissão de 24 de abril de 2014 que altera o anexo do Regulamento (UE) n° 37/2010 relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal, no que se refere à substância ivermectina. Jornal Oficial da União Europeia, L 124, p 19-21, Abr. 2014.

US FDA. US Food and Drug Administration. Freedom of Information Summary **NADA 140-833 IVOMEK Plus Injection for Cattle**. 2014. Disponível em: <<https://animaldrugsatfda.fda.gov/adafda/views/#/home/previewsearch/140-833>> Acesso em: 04 fev 2018.

US FDA. US Food and Drug Administration. Freedom of Information Summary **NADA 141-079 Ivomec® Eprinex™ Pour-On for Beef and Dairy Cattle**. 1998. Disponível em: <<https://animaldrugsatfda.fda.gov/adafda/views/#/home/previewsearch/141-079>> Acesso em: 04 fev 2018.

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.

WATKINS, P.B. The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 27, p.161–170, 1997.

WHELAN, M. et al. Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 27, p. 4612-4622, 2010.

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.

YANG, B. et al. Residue depletion and tissue-plasma correlation of methyl-3-quinoxaline-2 carboxylic acid after dietary administration of olaquinox in pigs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 2, p. 937-42, 2010.