



Determinação do período de carência de doramectina a 1% em tecidos bovinos

Determination of the 1% doramectin grace period in bovine tissues

**Rosanne Aparecida Capanema Ribeiro¹, Elaine Alves dos Santos², Otávio Augusto Martins³,
Fernanda Raghianti⁴**

Resumo: O presente trabalho teve como objetivo determinar o período de carência da doramectina a 1% em músculo, gordura, rim e fígado de bovinos aplicada na concentração de 1%, por via subcutânea, na dose de 1 ml/50 Kg (200 µg/kg) em bovinos. Foram avaliados no experimento 20 animais, divididos em cinco grupos contendo quatro animais cada e abatidos nos momentos D+7 (grupo A), D+14 (grupo B), D+28 (grupo C), D+35 (grupo D) e D+42 (grupo E). Os Limites Máximos de Resíduos estabelecidos pelo *Codex Alimentarius Commission* para Doramectina no músculo, fígado, gordura e rins, são 10 µg/kg, 100 µg/kg, 150 µg/kg e 30 µg/kg, respectivamente. A partir de 28 dias após o tratamento, os resultados já se encontravam abaixo desses valores, portanto, de acordo com o método alternativo de determinação de período de carência estabelecido pelo EMEA/CVMP/036/95 Final, definiu-se para a doramectina a 1% o período de carência de 31 dias.

Termos para indexação: Limite máximo de resíduos, antiparasitário, saúde pública.

Abstract: The present work aimed to determine the grace period for 1% doramectin in muscle, fat, kidney and liver of cattle applied at a concentration of 1%, subcutaneously, at a dose of 1 ml/50 Kg (200 µg/kg) in cattle. Twenty animals were evaluated in the experiment, divided in five groups, each one containing four animals slaughtered at the moments of D+7 (group A), D+14 (group B), D+28 (group C), D+35 (group D) and D+42 (group E). The maximum residue limits established in *Codex Alimentarius Commission* for Doramectin in muscle, liver, fat and kidney, are 10 µg/kg, 100 µg/kg, 150 µg/kg e 30 µg/kg, respectively. After 28 days of the treatment, the results were below these values, therefore, according to the alternative approach for withdraw period stated in EMEA/CVMP/036/95 Final, the withdraw period determined for 1% doramectin was 31 days.

Index terms: Maximum residue limit, antiparasitic, public health.

<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20200047>

Autor para correspondência. E-mail: fernanda.raghianti@iftm.edu.br

Recebido em 10.07.2020. Aceito em 30.12.2020

1 Especialista, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro (IFTM), Campus Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. E-mail: rosannecr@yahoo.com.br

2 Mestrado, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro (IFTM), Campus Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. E-mail: elaine.alves@iftm.edu.br

3 Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil. oamartins@fmvz.unesp.br

4 *Doutorado, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro (IFTM), Campus Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. *E-mail: fernanda.raghianti@iftm.edu.br

Introdução

A utilização de medicamentos veterinários tem importante papel na manutenção da saúde animal e prevenção de doenças, possibilitando a disponibilidade de produtos saudáveis e inócuos destinados à alimentação humana. Sua ampla utilização tem contribuído para o desenvolvimento da pecuária, diminuindo as taxas de mortalidade animal e aumentando a produtividade do rebanho (CASELANI, 2014).

No entanto, é crescente a preocupação dos consumidores em relação à presença de resíduos químicos em alimentos de origem animal, o que constitui um sério problema de segurança alimentar, já que, se estiverem em concentrações superiores ao limite máximo de resíduo (LMR), podem levar a prejuízos para a saúde humana provocando reações alérgicas, disfunções hepáticas e digestivas, problemas cardíacos, entre outros (PRESTES et al., 2013).

A presença de resíduos de produtos veterinários é relevante não apenas em relação à saúde dos consumidores, mas também apresenta impacto na esfera econômica, comprometendo especialmente relações comerciais internacionais, onde há diferentes LMR's estabelecidos para os

diversos mercados para onde o Brasil exporta (MARTIN, 2011; PACHECO-SILVA et al., 2014). Por isso, é necessário estabelecer um período de carência, onde as concentrações de resíduos em produtos de origem animal apresentam níveis seguros para quem consome esse alimento.

Dentre os medicamentos veterinários mais utilizados no mundo, pode-se citar os vermífugos, responsáveis por controlar infecções causadas por parasitas, o que é necessário para a preservação da saúde animal e viabilidade econômica da produção. O grupo das avermectinas é o mais utilizado, e as moléculas pertencentes a esse grupo, como a doramectina, são isoladas a partir do fungo *Streptomyces avermitilis* (RÚBIENS et al., 2015; CAMPBELL, 2016).

Entretanto, em 2011, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) decretou a Instrução Normativa nº 48, proibindo em bovinos de corte criados em confinamentos e semiconfinamentos o uso de produtos antiparasitários contendo princípios ativos da classe das avermectinas cujo período de carência fosse maior que 28 dias (Brasil, 2011).

Tendo em vista o reduzido número de trabalhos que se destinam a identificar a presença de resíduos de fármacos

veterinários em matrizes biológicas bovinas, e que tanto o mercado interno quanto externo, cada vez mais exigem alimentos saudáveis e de qualidade, ou seja, livres de substâncias químicas, é importante determinar as concentrações de resíduo de doramectina a 1% nos tecidos de bovinos a fim de determinar o período de carência do mesmo.

O objetivo do presente estudo foi quantificar as concentrações do resíduo de doramectina a 1% em matrizes biológicas (músculo, fígado, gordura e rim) de bovinos tratados com este medicamento, administrado pela via subcutânea na dose de 1 ml/50 Kg para determinação do período de carência.

Materiais e Métodos

Este estudo foi executado na Fazenda Experimental Cachoeira, localizada em Minas Gerais e o material coletado foi enviado ao laboratório analítico LABTEC. A etapa experimental foi conduzida de acordo com os princípios das Boas Práticas Clínicas (VICH GL9 – GCP) e o *Codex Alimentarius Commission* (July 2015). A utilização dos animais no estudo ocorreu de acordo com a Lei nº 11.794 de 08/10/2008 que estabelece os procedimentos para uso de animais em experimentação científica, prezando o bem-estar animal.

O protocolo deste estudo foi submetido à Comissão de Ética para o Uso

de Animais em Experimentação da Gaia Pesquisa e Desenvolvimento em Saúde Animal e a etapa experimental só se iniciou após a aprovação (nº 022/04-14) do mesmo.

Animais

Foram utilizados 20 bovinos mestiços (o número de animais deste estudo foi estabelecido com base no guia do VICH GL 48), sendo 10 machos e 10 fêmeas em bom estado nutricional, examinados clinicamente 7 dias antes do tratamento e que não foram medicados com antiparasitários ou outro medicamento dentro de 90 dias antes do início deste estudo (VICH GL 48).

Tratamentos

No dia do tratamento com a doramectina a 1% administrada pela via subcutânea na dose de 1 ml/50 Kg (200 µg/kg), os 20 animais foram distribuídos (de acordo com o sexo e peso obtido neste dia) dentro de 5 grupos (A, B, C, D e E), correspondente aos diferentes tempos de abate, com 4 animais/grupo, distribuídos em 2 machos e 2 fêmeas, com o intuito de obter grupos com sexo e peso homogêneos.

Amostras

A partir do dia do tratamento com a doramectina a 1% foi realizado o abate humanitário dos animais, nos momentos D+7 (grupo A), D+14 (grupo B), D+28 (grupo C), D+35 (grupo D) e D+42 (grupo E) após o tratamento de acordo com o

grupo sendo colhidas amostras de tecidos (músculo, fígado, gordura e rim).

Foram colhidas aproximadamente 250 gramas para a amostra prova e 250 gramas para a contraprova de músculo e fígado e 200 gramas divididos em prova e contraprova para gordura e rim.

A colheita dos tecidos ocorreu durante o abate seguindo a Instrução Normativa nº 3 — Abate Humanitário de Animais de Açougue (Brasil, 2000). E os sacos plásticos contendo as amostras foram previamente identificados com etiqueta autoadesiva e posteriormente permaneceram refrigerados a 4°C em isopor com gelo seco. Após o término do abate do último animal de cada grupo, os tecidos foram transportados em caixa de isopor contendo gelo seco até o laboratório e armazenados sob refrigeração a -20°C. A contraprova de cada amostra foi mantida no local do ensaio experimental até que os resultados finais da análise laboratorial fossem obtidos.

Determinação de doramectina

A quantificação de doramectina em cada amostra de tecido foi realizada em duplicata pelo laboratório analítico LABTEC, localizado em Hortolândia – São Paulo, por meio de metodologia analítica específica, validada de forma a possibilitar a análise para fins de estudo de carência, cujos Limites Máximos de

Resíduos (LMR) estipulados para doramectina a 1% nos tecidos músculo, fígado, gordura e rins, foram 10 µg/kg, 100 µg/kg, 150 µg/kg e 30 µg/kg, respectivamente.

Análise estatística

Para a análise estatística as diretrizes do guia EMEA/CMVP/036/95 definem que o primeiro método de escolha para determinação dos períodos de carência deve ser o de regressão linear, porém, nos casos onde a aplicação dessa metodologia fica impossibilitada, como no presente estudo, utiliza-se o método alternativo.

No método alternativo, considera-se como período seguro aquele tempo de colheita no qual todas ou a maioria das amostras apresentam seus valores de concentração abaixo do LMR com adição de um fator de segurança (*safety spam*) que varia entre 10 e 30%. Este racional foi derivado da premissa definida do item 1.2 do Guia EMEA/CMVP/036/95 Final (APPROACH TOWARDS HARMONISATION OF WITHDRAWAL PERIODS).

Resultados e Discussão

Neste estudo, utilizou-se o LMR definido pelo *Codex Alimentarius Commission* e os resultados das análises laboratoriais dos tecidos bovinos retirados de animais tratados com doramectina a 1%

(Tabela 1) demonstraram que até o dia 14 após o tratamento houve quantificação do medicamento teste nos tecidos analisados.

A partir da avaliação do grupo C (28 dias após o tratamento) os resultados se

encontraram abaixo do limite de quantificação ou não se detectou a presença de doramectina a 1% nos tecidos analisados.

Tabela 1: Momento de avaliação, grupos experimentais, identificação das amostras, LMR e resultados das concentrações de doramectina a 1% ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) em músculo, fígado, gordura e rim de bovinos.

Momento	Grupo	ID animal	Tecido – doramectina a 1%			
			Músculo	Fígado	Gordura	Rim
			LMR - 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	LMR - 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	LMR - 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$	LMR - 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$
D+7	Grupo A	1	28,22	262,6	350,27	241,63
		2	35,14	274,96	415,25	220,21
		3	25,64	194,36	356,38	204,63
		4	25,54	261,61	365,82	237,44
		Média	28,64	248,38	371,93	225,98
		D. P.	4,51	36,52	29,58	16,98
D+14	Grupo B	5	8,34	83,03	112,03	67,16
		6	10,63	82,76	185,02	101,82
		7	8,43	112,6	146,4	104,21
		8	23,73	96,56	164,41	169,18
		Média	12,78	93,74	151,97	110,59
		D. P.	7,37	14,13	30,95	42,57
D+28	Grupo C	9	ND	ND	ND	< LQ
		10	ND	ND	ND	< LQ
		11	ND	ND	ND	< LQ
		12	ND	ND	ND	< LQ
D+35	Grupo D	13	< LQ	< LQ	< LQ	ND
		14	ND	< LQ	< LQ	ND
		15	ND	ND	< LQ	ND
		16	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
D+42	Grupo E	17	ND	ND	ND	ND
		18	< LQ	< LQ	< LQ	ND
		19	ND	ND	ND	ND
		20	< LQ	ND	ND	ND

*LQ=limite de quantificação; LMR= limite máximo de resíduo; ND= não detectado

Para que um medicamento veterinário utilizado em animais que serão destinados à produção de alimentos seja aprovado, é imprescindível demonstrar

dados que determinem o período de segurança/carência de cada formulação, obedecendo o LMR estabelecido, para garantir que não haja riscos à saúde do

consumidor (REEVES, 2007).

O LMR é estabelecido com base na ingestão diária aceitável (IDA), que é determinado por testes farmacológicos, toxicológicos e microbiológicos e leva em conta a identificação de um nível apropriado onde a quantidade de resíduo é considerado sem qualquer risco, incluindo um fator de segurança adequado (ESCRIBANO et al., 2012).

Ao realizar a análise estatística dos resultados quantificados (Tabela 2) entre os momentos experimentais, observou-se

Tabela 2: Análise estatística de quantificação de resíduo de doramectina a 1% em músculo, fígado, gordura e rim nos momentos D+7 e D+14.

Momentos	Músculo	Fígado	Gordura	Rim
D+7	28,64±4,51 ^{Aa}	248,38±36,52 ^{Ab}	371,93±29,58 ^{Ac}	225,98±16,98 ^{Ab}
D+14	12,78±7,37 ^{Aa}	93,74±14,13 ^{Bb}	151,97±30,95 ^{Bb}	110,59±42,57 ^{Bb}

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ao observar, em cada momento, as concentrações de doramectina a 1% nos diferentes tecidos, percebeu-se que houve variação entre eles, sendo que gordura e fígado demonstraram os maiores valores médios. Para as lactonas macrocíclicas (como as avermectinas), os LMR estabelecidos para gordura e fígado, de modo geral, são maiores quando se compara com músculo e rim, o que sugere que são tecidos mais indicados para o monitoramento de resíduos (DANAHER et al., 2006).

que apenas o músculo permaneceu estatisticamente igual pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), tanto em 7 quanto em 14 dias após o tratamento.

No entanto, dentro do momento D+7 as matrizes se diferiram entre si, sendo que apenas fígado e rim foram estatisticamente iguais. Já no momento D+14, fígado, gordura e rim foram estatisticamente iguais, e os valores encontrados para o músculo se diferiram estatisticamente das demais amostras analisadas.

Os dados encontrados neste estudo se diferiram do que foi descrito no EMEA/MRL/136/96-FINAL, onde a administração do medicamento foi realizada por via intramuscular, porém, de acordo com a farmacocinética realizada previamente não houve diferença entre as vias intramuscular e subcutânea em bovinos para a dose de 200 µg/kg.

No EMEA/MRL/136/96-FINAL, observou-se que pelo método de *contagem da cintilação* em fase líquida,

sete dias após o tratamento (D+7) os valores médios de resíduo em gordura, fígado, músculo e rim foram respectivamente de 551µg/kg, 470 µg/kg, 40µg/kg e 108 µg/kg, caindo para 23 µg/kg, 24 µg/kg, menos que 3 µg/kg e 4 µg/kg 42 dias (D+42) após o tratamento. Enquanto no presente experimento, no momento D+7, encontrou-se 371 µg/kg, 248 µg/kg, 28 µg/kg e 225 µg/kg para gordura, fígado, músculo e rim, sendo que a partir de D+28 os resultados encontraram-se abaixo do limite de quantificação ou não se detectou a presença de doramectina a 1% nos tecidos analisados.

Para determinação do período de carência, o guia EMEA/CVMP/036/95 Final preconiza o método de regressão linear, onde se utiliza o mínimo de três pontos distintos de abate para a obtenção de uma reta de regressão linear com confiabilidade mínima. Porém, esse cálculo fica impossibilitado de ser aplicado, como por exemplo, quando não há formação do número mínimo de pontos para estabelecimento de uma reta de regressão. Um caso típico é aquele onde as concentrações na amostra alcançam níveis significativos (>LOQ) nos 2 primeiros pontos de coleta, mas não nos subsequentes. Desta forma não há formação de 3 pontos (tempos diferentes de colheita) para a aplicação de uma reta

de regressão linear.

No presente estudo, não foi possível aplicar o método preconizado, portanto, aplicou-se o método alternativo, derivado da premissa definida do item 1.2 EMEA/CVMP/036/95 Final. Para este método, utilizou-se o próximo período em que os valores foram abaixo do LMR, sendo este o D+28, aplicando um fator de segurança de 10%, uma vez que nesta data não foram detectadas nenhuma concentração acima do Limite de Quantificação. Desta forma, para todas as matrizes (músculo, rim, fígado e gordura), o período de depleção estimado para doramectina a 1% foi de 30,8 dias, ou seja, 31 dias.

Esse resultado pode ser considerado similar ao do estudo conduzido por Mangerona et al. (2014), realizado com a mesma dose e via de administração, onde notou-se que o período de carência determinado foi de 28 dias após o tratamento com o produto Exceller® (cujo princípio ativo é doramectina a 1%).

Contudo, sabe-se que mesmo se tratando de medicamentos veterinários que apresentem o mesmo princípio ativo, é possível encontrar diferenças entre períodos de carência e LMR, já que há disponível diferentes tipos de composições de produtos, dosagens e vias de administração, além de variações entre a espécie-alvo, comportamento

farmacocinético, entre outros (ESCRIBANO et al., 2012).

Ademais, além de ações governamentais realizadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a indústria processadora tem responsabilidade de garantir um nível seguro de resíduos a fim de proteger a saúde dos consumidores e de cumprir com os requisitos acordados com os clientes importadores, portanto, é importante que se tenha conhecimento a respeito dessa área de estudo para que seja possível estabelecer um plano de amostragem, análises e ações corretivas e de prevenção em caso de detecção de violações.

Conclusão

Os vermífugos são importantes para evitar prejuízos econômicos e garantir o bem-estar e desenvolvimento dos animais. No entanto, deve ser utilizado de maneira adequada e com responsabilidade, respeitando a posologia indicada e o período de carência. Vermífugos à base de doramectina a 1% possuem período de carência relativamente longo e que pode variar por diferentes fatores e dependendo do órgão ou tecido avaliado. Portanto, para a produção de alimentos inócuos e livres de resíduos, é fundamental que os produtores entendam a necessidade de se respeitar esse intervalo de tempo. Além disso, deve haver sempre fiscalização e controle dos resíduos por parte do governo

e das empresas produtoras de alimentos, a fim de garantir a conformidade do produto com o LMR estabelecido, tanto para mercado externo quanto interno.

Referências Bibliográficas

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). Secretaria da Defesa Agropecuária (SDA). Instrução Normativa n.3, de 17 de janeiro de 2000. **Diário Oficial da União**, Seção 1, p.14-16. Brasília, DF, 24 de janeiro de 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria da Defesa Agropecuária (SDA). Instrução Normativa n. 48, de 28 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 de dezembro de 2011.

BRASIL. Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei n. 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Seção 1, p.1. Brasília, DF, 9 de outubro de 2008.

CAMPBELL, W. C. Lessons from the History of Ivermectin and Other Antiparasitic Agents. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, n. 1, p. 1–14, 2016.

CASELANI, K. Resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 17, n. 3, p. 189-197, jul./set. 2014.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods. Updated as at the 38th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2015). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/codex-alimentarius-cac-mrl-n-o-02-2015-de-julho>>

2015.pdf>. Acesso em: 03 de fevereiro de 2020.

DANAHER, M.; HOWELLS, L. C.; CROOKS, S. R. H.; CERKVENIK-FLAJS, V.; O'KEEFFE, M. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. **Journal of Chromatography**, v. 844, p. 175–203, 2006.

EMA/CVMP/036/95- Note for Guidance: Approach Towards Harmonisation of Withdrawal Periods, 1996. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-approach-towards-harmonisation-withdrawal-periods_en.pdf>. Acesso: 03 de fevereiro de 2020.

ESCRIBANO, M.; SAN ANDRÉS, M.I.; de LUCAS, J.J.; GONZÁLEZ-CANGA, A. 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.

MANGERONA, A.M.; ARAÚJO, A.P.C. ; MOZZER, O. D.; VIEIRA, R. F.; QUEIROZ JÚNIOR, E. B. Determination of Exceller (1% doramectin) withdrawal period in tissues after subcutaneous route of administration in cattle. **A Hora Veterinária** v. 34, n. 201, p. 24-26, 2014.

MARTIN, J.G.P. Resíduos de antimicrobianos em leite—uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 80-87, 2011.

PACHECO-SILVA, É.; SOUZA, J.R.; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. 2014. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 111-122, 2014.

PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; FRIGGI, C. do A.; MUNARETTO, J. S.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 697-710, 2013.

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

RÚBIAS, A.; ANTKOWIAK, S.; GRANADOS, M.; COMPANYÓ, R.; CENTRICH, F. Determination of avermectins: a QuEChERS approach to the analysis of food samples. **Food chemistry**, Barcelona, v. 181, p. 57-63, 2015.

VICH GL9 – GCP. Guideline on Good Clinical Practices. June 2000. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/vich-gl9-good-clinical-practices-step-7_en.pdf> Acesso em: 03 de fevereiro de 2020.

VICH GL 48(R). Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: marker residue depletion studies to establish product withdrawal periods. Feb. 2015. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/vich-gl48-studies-evaluate-metabolism-residue-kinetics-veterinary-drugs-food-producing-animals_en.pdf> Acesso em: 03 de fevereiro de 2020.