

AVALIAÇÃO DE DOIS DIFERENTES MÉTODOS DE ARMAZENAGEM E PREPARO DE AMOSTRAS DE FÍGADO BOVINO PARA ANÁLISE QUANTITATIVA DE IVERMECTINA, UTILIZADOS POR UM FRIGORÍFICO DO ESTADO DE MINAS GERAIS

EVALUATION OF TWO DIFFERENT METHODS OF STORAGE AND PREPARATION OF BEEF LIVER SAMPLES FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF IVERMECTIN, USED BY A FRIDGE OF THE STATE OF MINAS GERAIS

Naiani Tartarine¹, Janser Moura Pereira², Quintiliano Siqueira Schroden Nomelini², Bruno Tumang Frare³, Luiz Fernando Moreira Izidoro^{3*}

¹*Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Campus Araraquara, São Paulo, Brasil.*

²*Faculdade de Matemática, Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.*

³*Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.*

**Endereço para Correspondência: Av. Pará, 1720, Bairro Umuarama, Campus Umuarama, Bloco 2U, Sala 23, Telefone: (34) 3225-8604, Uberlândia – MG, CEP 38400-902, E-mail: luiz.izidoro@ufu.br*

RESUMO

Dentre os antiparasitários controlados pelo Ministério da Agricultura e usados na pecuária, citamos a ivermectina, cuja concentração aceita na carne animal é bastante restrita. Tendo como base as metodologias laboratoriais de mensuração da concentração deste medicamento nos produtos alimentícios de origem animal, o objetivo deste trabalho foi avaliar duas diferentes metodologias de armazenagem e preparo de amostras de tecido hepático bovino, para dosagem do antiparasitário ivermectina, utilizadas em um frigorífico do estado de Minas Gerais. Os remanescentes de medicamentos não devem ultrapassar o Limite Máximo de Resíduo, e no caso da ivermectina baseou-se nos valores máximos de 33,33µg/kg para *pools* com 3 amostras, e 20µg/kg para *pools* contendo 5. As análises foram realizadas através da reação de ELISA do kit laboratorial *RANDOX Food Diagnostics*. Para comparação, aplicou-se a metodologia I (armazenagem e trituração de tecido hepático em *pool*), desenvolvida durante os meses de abril, maio e junho, e a metodologia II (armazenagem e trituração do tecido hepático separadamente) desenvolvida durante os meses de julho, agosto e setembro. Os resultados mensais obtidos demonstraram percentuais de violação iguais a 23,4%, 31,7%, 25%, para a metodologia I e 20,3%, 17%, 17,14% para a II. Nesse sentido, os resultados apresentados inferem que a metodologia II é mais eficaz na detecção do contaminante ivermectina.

Palavras-Chave: frigorífico; fígado bovino; ivermectina.

ABSTRACT

Among the antiparasitic controlled by the Ministry of Agriculture, and used in livestock, we cite to ivermectin, which accepts concentration in animal meat is rather restricted. Based on laboratory methodologies to measure the concentration of this drug in food products of animal origin, the aim of this study was to evaluate two different methods of storage and preparation of bovine liver tissue samples for determination of the ivermectin, used in meat processing company of the state of Minas Gerais. The remaining products should not exceed the maximum residue level, and in the case of ivermectin the maximum values established were 33.33µg/kg for pools with 3 samples, and 20mg/kg for pools containing 5 samples. Analyses were performed by ELISA reaction of the laboratory kit *RANDOX Food Diagnostics*. To compare, we applied the methodology I (storage and the milling of liver tissue in pool), held during the months of April, May and June, and the methodology II (storage and the milling of the liver tissue done separately) held during the months of July, August and September. The monthly results showed equal percentage of violation of 23.4%, 31.7%, 25%, 20.3%, 17% and 17.14% respectively. In this sense, the presented results infer that the methodology II is more effective in the detection of ivermectin contaminant.

Key Words: refrigerator; bovine liver; ivermectin.

INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos de origem animal, tanto para o consumo interno quanto para exportação, vem aumentando a necessidade de preocupação com a qualidade desses produtos no nosso país, bem como pelos países que compram do Brasil, esse tipo de material, uma vez que ela reflete diretamente na saúde humana. Com o propósito de ampliar a produção de alimentos para a humanidade, medicamentos veterinários são utilizados para o controle sanitário dos animais produtores de alimentos, dentre eles, os carrapaticidas, antibióticos/antimicrobianos e antiparasitários. De acordo com suas características físico-químicas, estes são absorvidos, metabolizados e excretados, podendo ainda assim serem encontrados na carne, leite e ovos (1). Esses alimentos são essenciais na dieta humana, pois são fonte de proteínas, ácidos graxos, vitaminas e sais minerais (2).

Quando detectados, em produtos alimentares, os medicamentos veterinários são considerados resíduos químicos, definidos pelo *Codex Alimentarius* (3), como qualquer substância aplicada ou administrada em alimento de origem animal, tais como carne ou leite, a animais que produzem, aves, peixes ou abelhas, que seja utilizado para fins terapêuticos – profiláticos ou de diagnóstico – ou para modificação de funções fisiológicas ou de comportamento.

Os remanescentes desses medicamentos não devem ultrapassar o limite máximo de resíduo (LMR) permitido e, para isso, devem ser utilizados de acordo com as recomendações da bula, indicando a aplicação das Boas Práticas no uso de Drogas Veterinárias (BPDV) (4), além de respeitar um período de carência, antes do aproveitamento do alimento.

Para controlar o uso de medicamentos veterinários no Brasil, existem dois programas de fiscalização. O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), que é coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo aplicado às carnes, leite, ovos, mel e pescados e o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMVet), coordenado pela Agência

Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), aplicado ao leite em pó e pasteurizado (2).

Dentre as especificações da bula de cada medicamento, estão incluídas a dose e o período de carência, ou seja, cujo período, ~~e~~ após a administração do medicamento, o animal pode ser abatido, no caso de animais produtores de carne, para que o LMR seja respeitado.

O LMR é a concentração máxima de resíduos que pode ser aceita nos alimentos, expressa em mg/kg ou µg/kg de peso fresco, variando a unidade de medida de acordo com o potencial e a frequência de aplicação do contaminante químico, e o produto no qual ele é aplicado. Portanto, o consumo de um alimento contendo resíduos de um medicamento veterinário e/ou seu metabólito no nível do LMR não deve representar um risco de para a saúde humana (3,5).

Em contrapartida, o uso exagerado e/ou indevido e o não cumprimento dos períodos de carência, podem acarretar na presença de uma quantidade que ultrapassa os limites estabelecidos de resíduos nos alimentos de origem animal, podendo então representar um risco para o consumidor.

No presente trabalho, o medicamento veterinário em questão é a ivermectina, pertencente ao grupo das avermectinas (lactonas macrolíticas), que são moléculas com forte atividade anti-helmíntica, cuja procedência é o seu isolamento a partir do fungo *Streptomyces avermitilis*. Além da ivermectina, são derivadas da fermentação do fungo outras lactonas macrolíticas principais: doramectina, abamectina, emamectina e eprinomectina, as quais, atualmente, encontram-se em vários medicamentos veterinários. A atividade anti-helmíntica da ivermectina, por atuar no sistema nervoso de invertebrados, colocou-a entre os compostos mais usados no combate à endoparasitas, especialmente nematoides e ectoparasitas artrópodes (6). De acordo com Vassilatis et al. (7), a sua ação no sistema nervoso dos parasitas ocorre através de canais de cloro, que, controlados pelo glutamato, promovem a hiperpolarização dos neurônios e conseqüentemente provocam distúrbios nas transmissões nervosas, causando a perda de coordenação motora, paralisia e morte dos parasitas.

Conforme El-Ashmawy *et al.* (8), o uso de ivermectina, sozinha ou combinada

no início do processo de gestação, pode provocar severas alterações cromossômicas. A administração de altas dosagens desse vermífugo em animais pode estar correlacionada aos sintomas clínicos dominantes de efeitos adversos e toxicidade, como: tremor, ataxia, depressão do SNC e coma, o que muitas vezes resulta em mortalidade (9), além de alterações cutâneas e manifestações clínicas de um estado gripal (10).

Tendo em vista a existência de diversos métodos de análises, devido à grande variedade de medicamentos veterinários utilizados nos animais produtores de alimentos e aos baixos níveis preconizados pelas agências reguladoras, o objetivo deste trabalho foi discutir sobre duas diferentes metodologias de armazenagem e preparo de amostras de tecido hepático bovino, para dosagem de ivermectina, em um frigorífico do estado de Minas Gerais, Brasil. A busca de uma metodologia mais eficaz para analisar a qualidade da carne brasileira proporciona benefícios econômicos à indústria, uma vez que, trabalhando dentro dos padrões exigidos pelo mercado, não coloca em risco contratos de exportação; além de zelar pela saúde da população consumidora desse tipo de alimento, dando, por fim, a estes e aos importadores, a certeza de que o produto final adquirido foi inspecionado corretamente.

METODOLOGIA

O frigorífico

O estabelecimento em questão encontra-se localizado no Triângulo Mineiro, Estado de Minas Gerais, e é vistoriado rigorosamente pelo Serviço de Inspeção Federal – SIF.

Princípios da empresa

No início de julho de 2010, a empresa implementou o programa de autocontrole para inspecionar a presença de contaminantes químicos, devido aos primeiros casos de violações internacionais que ocorreram em produtos cárneos exportados pelo Brasil. O programa surgiu porque o governo brasileiro suspendeu temporariamente os estabelecimentos habilitados à exportação desse tipo de produtos para os Estados Unidos. Esse programa visa a realização de visitas às

propriedades rurais, onde os animais são criados; exige que o produtor forneça uma carta com informações sobre a aplicação de medicamentos no lote de animais fornecido para abate; e assegura a realização de análises laboratoriais para detecção de resíduos de avermectinas em amostras coletadas durante o abate (11).

Obtenção dos animais

Para atender a demanda de abate da empresa, os animais foram comprados de vários criadores do Triângulo Mineiro, bem como de outras regiões de Minas Gerais e estados vizinhos. O número de animais de cada lote variou de acordo com a disponibilidade de cada fornecedor. Entende-se por lote o conjunto de animais provenientes de uma mesma propriedade/fornecedor, de determinado dia. Os lotes de cada dia receberam numeração ordinal com relação à sua chegada ao frigorífico, sendo esta ordem a mesma para o início do abate. Cada lote foi enumerado como 1, 2, 3, 4, sucessivamente, conforme ordem de chegada dos animais no frigorífico.

Abate dos animais e coleta das amostras

A dinâmica do frigorífico avaliado no presente trabalho teve início durante a compra dos bovinos provenientes de propriedades rurais previamente selecionadas; ou seja, propriedades que declaram respeitar o período de carência após o uso da ivermectina aplicada em seus animais, bem como a dosagem em relação ao peso de cada animal, considerando as especificações contidas na bula do fármaco. Na certeza de que esses critérios foram rigorosamente adotados, seguiu então, com o recebimento dos animais no curral. Nessa fase, os animais passaram por período de descanso até completo o esvaziamento gástrico. Em seguida, foram encaminhados para a seção de desinfecção e, na sequência, conduzidos para um boxe de insensibilização. Esse espaço é específico para o tamanho de um único animal, não permitindo que o mesmo execute grandes movimentos, facilitando, assim, maior precisão no disparo da pistola de atordoamento. Quando o animal encontrava-se inconsciente, o mesmo era removido do espaço e o abate finalizado pela sangria. Após abertura da carcaça, aproximadamente

150 gramas do fígado foram removidas para averiguar a presença do medicamento.

Período de realização das pesquisas

A realização das coletas e das análises aconteceram entre o período de abril a setembro, de 2014.

Crítérios para validação da carne em relação à presença da ivermectina

Para a coleta de amostras de fígado, foram selecionadas, por sorteio, 3 carcaças por lote, quando este era composto de 18 a 50 animais, e 5 carcaças quando o lote era composto de 51 a 500 animais. Para lotes com número de animais inferior a 18, não realizou-se coleta. Essa metodologia seguiu as normas internas da empresa, sendo impossível a violação das mesmas. Tais informações, bem como as quantidades máximas de ivermectina permitidas por *pool* de amostra, encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Descrição do número de amostras coletadas por lote e da quantidade de ivermectina permitida por *pool* de amostra.

Número de animais por lote	Quantidade de animais doadores de amostra	Quantidade de ivermectina permitida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) por <i>pool</i>
0 a 17	Não realiza-se coleta	-
18 a 50	3	33,33
51 a 500	5	20,00

A coleta do material a ser examinado foi realizada de duas formas distintas, nomeadas como Metodologia I e Metodologia II.

Metodologia I:

Esse procedimento foi realizado entre os meses de abril a junho, de 2014, onde as amostras coletadas dos animais sorteados foram acondicionadas em uma única embalagem plástica, formando o *pool* de amostras do lote. Posteriormente, no preparo das amostras para a extração do contaminante, esse *pool* foi inteiramente triturado, independentemente da variação de tamanho de cada amostra, tendo como consequência a diferença da quantidade de cada amostra que formou o *pool*. Foi separado para a análise, 5 gramas de tecido triturado.

Metodologia II:

Esse protocolo de coleta foi desenvolvido durante os meses de julho,

agosto e setembro de 2014, e as amostras coletadas dos animais sorteados foram armazenadas individualmente em embalagens plásticas distintas. Posteriormente, no preparo das amostras para a extração do contaminante, elas foram trituradas também individualmente, sendo o *pool* de amostras do lote formado somente após a trituração, com a junção de uma mesma medida de cada amostra para obtenção de 5 gramas de material, seguida de homogeneização.

Preparo das amostras coletadas

A trituração das amostras para ambas metodologias foi realizada em alta rotação, utilizando-se um liquidificador comum, durante 5 minutos.

A partir da formação dos *pool's* triturados, o procedimento foi idêntico para as duas metodologias. De cada *pool* (que representa um lote), pesou-se em um tubo de ensaio, 5 gramas de tecido triturado. Em seguida, acrescentou-se no tubo 10mL de acetonitrila, e levou-o para agitação em vortex por 1 minuto. Posteriormente, adicionou-se 5 gramas de óxido de alumínio neutro, 0,5 gramas de cloreto de sódio, e 2 gramas de sulfato de magnésio anidro, necessitando agitação vigorosa e imediata do tubo para que não ocorresse aglomeração. Foram adicionados 4mL de hexano, e agitou-se durante 1 minuto em vortex, seguindo com centrifugação por 12 minutos a 2840 rcf. Após a centrifugação, utilizando uma pipeta automática, transferiu-se 2mL da fase inferior do centrifugado para um novo tubo de ensaio, sempre cuidando-se para não pipetar a fase superior do mesmo, uma vez que esta é oleosa e pode causar alteração nos resultados finais. No novo tubo, acrescentou-se 0,25mL de dimetil-sulfóxido (DMSO), e em seguida levou-o a um concentrador de amostras à 65°C para fazer evaporação. Após a secagem, reconstituiu-se a amostra com 0,75mL da solução *Strenght Buffer*, e agitou-a por 2 minutos em vortex. Sucessivamente, diluiu-se a amostra reconstituída, passando para um novo tubo 0,20mL da mesma, e 0,20mL da solução *Wash Buffer*, e agitou-a em vortex por mais 2 minutos, resultando na solução final da amostra.

Determinação quantitativa de ivermectina através do método ELISA

O método aplicado para quantificar resíduos de ivermectina, nas amostras de fígado, foi o ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Utilizou-se o Kit ELISA AV 3447 para avermectinas, seguindo as instruções do fabricante Randox Laboratories Limited para o preparo das amostras e para o procedimento da reação.

As placas de ELISA foram montadas com a quantidade de poços correspondentes ao número de lotes (tubos) analisados por dia. Da solução final extraída de cada amostra, pipetou-se 0,10mL (100µg) nos respectivos poços da placa. Os tubos e os poços sempre foram numerados para critérios de organização. Após o preenchimento de todos os poços da placa, esta foi coberta com selo adesivo e incubada durante 1h, em temperatura ambiente -15°C a 25° C, longe da luz. Passado esse período, inverteu-se a placa para a retirada de todo o líquido, e lavou-a com a solução Wash-Buffer para lavagem de placas, por seis vezes, não ultrapassando o tempo de 15 minutos. Feito isso, a placa foi seca e nela acrescentou-se 0,125mL (125µg) da solução *One Shot Substrate* em cada poço, e incubou-se a placa da mesma maneira que foi feito anteriormente, agora por 20 minutos. Após esse tempo, pipetou-se em cada poço 0,10mL (100µg) da solução *Stop*, e fez-se a leitura em espectrofotômetro utilizando filtro de 450nm. Com os resultados obtidos, fez-se o cálculo do teor de Ivermectina na amostra em µg/kg, utilizando uma planilha desenvolvida especificamente pelo frigorífico para calcular a concentração da ivermectina.

Tratamentos estatísticos

Para comparar duas proporções (metodologias I e II), foi utilizado o teste baseado na aproximação da distribuição normal, conforme Walpole et al. (12). As hipóteses consideradas nos testes foram: i. hipótese nula considera que as duas proporções populacionais são iguais ($H_0: p_1 = p_2$), ii. hipótese alternativa considera que as duas proporções populacionais são diferentes ($H_1: p_1 \neq p_2$); ou seja, avaliar se há diferença entre as duas metodologias ($p_1 =$ metodologia I e $p_2 =$ metodologia II), através do software R (13). Para o estudo descritivo da concentração de ivermectina, foi realizado inicialmente o teste de Normalidade de Shapiro-Wilk, para checar a simetria das distribuições e, posteriormente,

descrever as variáveis a partir de médias (simétrica ou Normal) e por medianas (assimétrica ou não-Normal).

Para avaliar a média da concentração de ivermectina, foi feito a modelagem dos dados, a partir de um delineamento inteiramente ao acaso (DIC), em esquema fatorial 2x2 com 3 repetições, sendo os fatores as diferentes metodologias (I e II) e amostras (violadas e não violadas). Foram verificadas as pressuposições do resíduo do modelo, sendo o teste de Shapiro-Wilk para Normalidade dos resíduos, Levene para homogeneidade das variâncias e Durbin-Watson para a independência dos resíduos. Satisfeitas essas pressuposições, foi feito o teste F da análise de variância (ANOVA) para verificar a significância dos fatores e interação, ao teste significativo foi comparado às médias. O gráfico foi construído usando a versão do software GraphPad Prism 5.0.

RESULTADOS

Conforme orientações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), quando um produtor rural trata seu rebanho bovino direcionado ao abate com o medicamento ivermectina, há a necessidade real de aguardar um período de carência que antecede ao sacrifício dos animais, além de respeitar a dose administrada, conforme orientações do fabricante. Com o intuito de averiguar se os pecuaristas estão respeitando tais determinações, quando o frigorífico compra um lote de animais e os mesmos são abatidos, o esperado é que a concentração do fármaco não ultrapasse os seguintes valores: para uma única amostra analisada, o limite máximo de resíduo (LMR) permitido é 100µg/kg, e para os *pools* contendo três amostragens, o LMR permitido é 33,33µg/kg ($100/3 = 33,33$). Já para aqueles com cinco amostras analisadas, o LMR permitido é 20µg/kg ($100/5 = 20$), de modo que, quaisquer concentrações de ivermectina superiores a 100µg/kg, 33,33µg/kg e 20µg/kg respectivamente, são consideradas violadas (concentração superior ao máximo aceitável) e as carnes oriundas dessas amostras não devem ser aproveitadas.

A tabela 2, a seguir, apresenta os valores de estatísticas descritivas, como média, mediana e seus respectivos intervalos

de confiança de 95% para as concentrações de ivermectina obtidas, ao longo dos 6 meses relacionados com o desenvolvimento da pesquisa, tanto para as amostras consideradas violadas, quanto para aquelas não violadas.

Tabela 2: Resultados mensais da concentração de ivermectina ($\mu\text{g}/\text{kg}$), extraída de fígados bovinos.

Mês	Concentração de ivermectina ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	Amostra violada	Amostra não violada
Abril	76,75 [67,97 – 85,54]* $p = 0,268$	11,23 [9,45 – 13,00]* $p = 0,890$
Maio	68,30 [59,52 – 77,08]* $p = 0,279$	11,6 (9,84 – 13,77)** $p = 0,024$
Junho	73,11 (58,50 – 102,1)** $p = 0,006$	10,71 (8,70 – 17,30)** $p = 0,002$
Julho	71,96 [60,96 – 82,96]* $p = 0,839$	12,62 [10,60 – 14,63]* $p = 0,461$
Agosto	64,73 [45,98 – 83,48]* $p = 0,082$	10,57 [9,12 – 12,02]* $p = 0,287$
Setembro	65,17 [52,24 – 78,10]* $p = 0,174$	11,23 [9,57 – 12,89]* $p = 0,684$

*Média e seu intervalo de 95% de confiança;
**Mediana e seu intervalo de 95% de confiança;
 p = valor p do teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a concentração de ivermectina.

A tabela 3, apresentada na sequência, traz os resultados referentes ao Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), em esquema fatorial 2x2, com interação não significativa para avaliar o efeito das metodologias e das amostras em relação à concentração ivermectina.

Tabela 3: Média das concentrações de ivermectina ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de um DIC em esquema fatorial 2x2, com interação não significativa e pressupostos acerca dos resíduos do modelo.

Metodologia	Concentração Média de ivermectina	Valor- p
Metodologia I	45,05	0,114
Metodologia II	39,38	
Amostra		
Violada	72,59	< 0,001
Não violada	11,84	
Pressupostos		
Shapiro-Wilk (normalidade)	0,88	0,10
Levene (homogeneidade)	3,75	0,06
Durbin-Watson (independência)	2,37	0,75

Ao confrontar os indicadores, quantidade total de lotes de animais abatidos

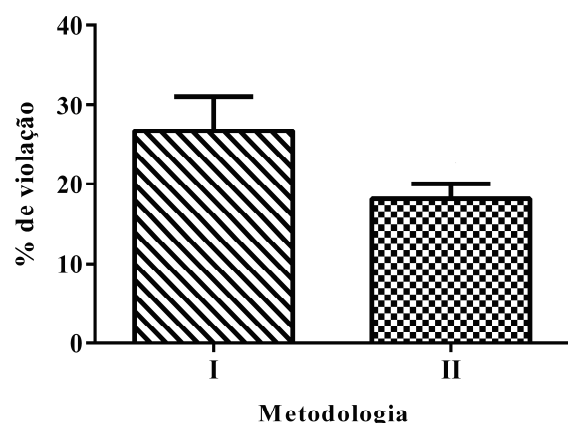
com as metodologias I e II, adotadas durante a coleta/armazenamento do tecido hepático usado para qualificar e mensurar o contaminante ivermectina, ficou evidente que a metodologia II proporcionou menor quantidade de lotes violados em relação à outra técnica. Esses valores, quando traduzidos para porcentagem, exprimem redução no percentual de violações, conforme apresentado na tabela 4.

Tabela 4: Número de lotes analisados e violados, e suas respectivas porcentagens (%) de violações, obtidas através das metodologias I e II, aplicadas durante os meses de abril a junho e julho a setembro de 2014, respectivamente.

Metodologia	Mês	Lotes	Lotes	Violações (%)
		Analisad os	Violad os	
Metodologia I	Abril	495	116	23,4
	Maio	470	149	31,7
	Junho	408	102	25
Metodologia II	Julho	403	82	20,3
	Agosto	247	42	17
	Setembro	280	48	17,14

Quando realizamos o cálculo da média da porcentagem das violações, observadas a partir das metodologias I e II, verificamos que, durante os meses de julho, agosto e setembro foi detectado um menor percentual médio de amostras violadas, de acordo com a figura 1.

Figura 1: Média das porcentagens de violação, conforme as metodologias utilizadas.



Além disso, a aplicação de teste estatístico que explorou a comparação entre proporções de violações, bem como suas porcentagens médias, revelou diferença

significativa entre as duas metodologias, conforme apresentado na tabela 5.

Tabela 5: Resultados do teste para comparação entre proporções de violações entre os dois procedimentos.

Metodologia I			Metodologia II			p-valor
Nº violações	Nº lotes	%	Nº violações	Nº lotes	%	
367	1373	26,73	172	930	18,50	< 0,000

DISCUSSÃO

A presença de parasitas que agridem o rebanho bovino é uma constante em todo o mundo, favorecendo a indústria farmacêutica, que sempre inova o mercado com o desenvolvimento de novas drogas com potencial antiparasitário. Dentre os vários fármacos explorados com essa finalidade, destaca-se a ivermectina, potente antiparasitário (14). Entretanto, a ingestão desse medicamento pode acarretar efeitos indesejados para os humanos, conforme orientações explicitadas na bula, além de desequilíbrio ecológico, conforme estudos realizados por Baena-Días *et. al.* (15). Nesse sentido, principalmente a comunidade externa fiscaliza de forma criteriosa a presença desse tipo de resíduo em lotes de diversos tipos de carnes importadas de diversos países, inclusive do Brasil.

Para garantir a certeza da comercialização de produtos livres desse tipo contaminante, o frigorífico ora estudado desenvolveu metodologias distintas para detectar ivermectina, na tentativa de melhorar a execução do programa de autocontrole de contaminantes químicos. Frente ao maior percentual de violações observadas no lotes abatidos, aplicando a metodologia I, podemos inferir que esses dados podem estar vinculados ao armazenamento errôneo, além do modo de processamento das amostras, onde temos amostras A, B e C, ou A, B, C, D e E com tamanhos diferentes, já que a medida das amostras coletadas é aproximada, armazenadas em um mesmo recipiente formando um *pool* e, posteriormente, processadas juntas. A partir dessa metodologia, temos as seguintes variáveis: i)

não houve o controle de quantas dentre as amostras sorteadas estavam contaminadas em cada *pool*; ii) não se sabe qual das amostras do *pool* estavam contaminadas, se era uma amostra de maior ou menor tamanho; iii) caso a amostra contaminada fosse a maior, poderia contaminar todo o *pool*, indicando um resultado falso-positivo.

Outra possibilidade para esse alto índice de violação, pode estar relacionado às seguintes interferências no período pré-abate: i) apesar das orientações aos pecuaristas, não é possível saber se todos realmente respeitaram o período de carência do medicamento com todos os animais do lote vendido; ii) se em um lote de 50 animais, 3 tiverem sido abatidos antes do período de carência, há a possibilidade de, através da análise, acusar-se a violação do lote todo, uma vez que as 3 amostras analisadas são escolhidas por sorteio; iii) é necessário considerar a possibilidade do pecuarista ter aplicado quantidades acima daquelas recomendadas por animal, o que talvez, poderia acusar falso-positivo, mesmo sendo respeitado o período de carência (15).

Os resultados obtidos pela aplicação da metodologia II resultaram em um menor número de lotes violados, bem como diminuição na porcentagem de violação. Esse novo cenário pode estar relacionado ao modo de como as amostras foram trabalhadas para a formação do *pool* de material a ser analisado. A aplicação de tratamentos estatísticos nesses resultados indicou com nível de 5% de significância não haver diferença estatística entre as concentrações médias de ivermectina, considerando as metodologias desenvolvidas, porém o critério violação apresentou maior concentração ($p < 0,001$). Além disso, todos os pressupostos acerca do resíduo do DIC foram atendidas ao nível de 5% de significância.

A priori, esses dados nos permitem inferir que a metodologia II é mais confiável, a qual houve uma diminuição estatisticamente significativa das porcentagens médias de violações. Entretanto, devemos considerar que os animais usados para o desenvolvimento da metodologia II, podem não ter sido submetidos aos possíveis agravantes pré-abate. Porém, se considerarmos que todos os pecuaristas respeitaram as normativas de administração do fármaco, bem como os

períodos de carência, essa diminuição nas porcentagens de violação fica fortalecida pelo tipo de coleta do tecido hepático dos bovinos abatidos.

De acordo com Prata (16), a praticidade e a eficácia das medidas de controle impostas pelo programa de autocontrole, com base na monitoração de resíduos de avermectinas, em duas matrizes amostrais: fígado e músculo de bovinos abatidos. Seu estudo analítico demonstrou porcentagens de violação de limite de resíduos químicos para as amostras de frigoríficos de diversos estados do Brasil. Nessa coleta, 37,98% das amostras de fígado bovino analisadas apresentaram violação. Essa porcentagem é bastante semelhante à observada no trabalho ora apresentado, quando discorremos cerca da metodologia I. Esses dados permitem enfatizar o agravamento do problema no chamado elo primário da produção de carne brasileira, que se trata do manejo inadequado dos animais destinados ao abate com relação à aplicação de fármacos pelos pecuaristas.

A grande maioria dos trabalhos encontrados na literatura teve como objetivo apenas avaliar estatísticas de contaminação de carcaças bovinas por avermectinas, aplicando sempre o mesmo método de coleta e armazenagem de amostras, sendo elas coletivas, ou seja, em *pool*, independente do tipo de análise realizada (ELISA e CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência) (16-

18). No presente trabalho, buscou-se enfatizar uma alternativa de redução de indicadores de violação em um segundo elo, a análise química propriamente dita, empregando uma metodologia de armazenagem de amostras e produção de um *pool* para análise diferente das convencionais, metodologia I.

CONCLUSÃO

Levando em consideração todas as variáveis apresentadas na discussão, não podemos confirmar que os resultados obtidos, quando comparados, indicam maior eficiência da metodologia II. Porém, quando argumentamos sobre as duas, podemos facilmente concordar que, por uma questão de ordem e seguimento de padrões, a metodologia II muito provavelmente mostra-se mais eficiente, uma vez que nela não há contaminação cruzada, e os *pools* são sempre padronizados. Concluiu-se, então, que, mesmo não podendo utilizar os resultados para confirmação da eficiência da metodologia II, pode-se deixar uma forte sugestão de que ela é mais eficaz, simplesmente pela sua correta e segura aplicação. O trabalho pode ainda sugerir a continuidade do estudo, utilizando, agora, metodologias I e II em amostras iguais, e oriundas de um mesmo lote, com intuito de elucidar maior eficiência da segunda metodologia.

REFERÊNCIAS

(1) KAN, C. A.; PETZ, M.; J. AGRIC. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 48, n. 12, p. 6397-6403, dez. 2000.

(2) SILVA, E. P.; SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. Resíduos de Medicamentos Veterinários em Leite e Ovos. **Química Nova**, [s.l.], v. 37, n. 1, 111-122, 2014.

(3) CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, Procedural Manual, Rome 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3243e.pdf>>. Acesso em: 11 jun. 2018.

(4) BRASIL (País). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa Nº 42, de 20 de Dezembro de 1999 publicada no DOU de 22/12/1999, Seção 1, Página 213. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/instrucao-normativa-sda-n-o-42-de-20-de-dezembro-de-1999.pdf/view>>. Acesso em: 11 jun. 2018.

(5) AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Relatório PAMVet, 2006. Programa de Análise de Resíduos de

Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet. Relatório 2004/2005 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395364/PAMVet->

+Monitoramento+de+Resíduos+em+Leite+Exposto+ao+Consumo+++Relatório+2006-2007/4777c371-e5b5-42e0-9c3f-43670009a802>. Acesso em: 11 jun. 2018.

(6) OLIVEIRA, V. M.; OLIVEIRA, R.; AMORIM, M. J. B.; DOMINGUES, I.; SOARES, A. M. V. M. Os medicamentos veterinários no meio ambiente: aplicações e implicações. **Revista Captar: Ciência e Ambiente Para Todos**, [s.l.] v.1, n.2, p. 183-192, 2009.

(7) VASSILATIS, D. K.; ARENA, J. P.; PLASTERK, R.; WILKINSON, H. A.; SCHAEFFER, J. M.; CULLY, D. F.; PLOEG, L. H. T. V. D. Genetic and biochemical evidence for a novel avermectin-sensitive chloride channel in *Caenorhabditis elegans* - Isolation and characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 272 n. 52, p. 33167-74, dez. 1997.

(8) EL-ASHMAWY, I. M., EL-NAHAS A. F., BAYAD, A. E. Teratogenic and cytogenetic effects of ivermectin and its interaction with P-glycoprotein inhibitor. **Research in Veterinary Science** [s.l.], v. 90, [s.n.], p. 116-123, 2011.

(9) TRAILOVIC, S. M., IVANIVIC, S. R., VARAGIC, V. M. Ivermectin effects on motor coordination and contractions of isolated rat diaphragm. **Research in Veterinary Science**, [s.l.], v. 91, [s.n.], p. 426-433, 2011.

(10) ARONSON, J. K. **Meyler's side effects os the drugs**: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions, Oxford: Elsevier Science, 2016.

(11) BRASIL (País). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento: Circular Nº 016/2010/DIPOA Certificação Revisão e revalidação dos planos APPCC. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/aceso-a-informacao/auditorias/2013/secretaria-executiva-se.pdf>>. Acesso em: 11 jun. 2018.

(12) WALPOLE, R. E.; MYERS, R. H.; MYERS, S. L.; YE, K. **Probabilidade e estatística para engenharia e ciências**. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2009.

(13) R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**: R Foundation for Statistical Computing. Vienna: Austria, 2015.

(14) Nandi, A.; Sagar, V. S.; Chigure, G.; Fular, A.; Sharma, A. K.; Nagar, G.; Kumar, S.; Saravanan, B. C.; Ghosh, S. Determination and validation of discriminating concentration of ivermectin against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, [s.l.] v. 250, [s.n.], p. 30-34, 2018.

(15) Baena-Díaz, F.; Martínez, M. I.; Gil-Pérez, Y.; González-Tokman, D. Trans-generational effects of ivermectin exposure in dung beetles. **Chemosphere**, [s.l.], v. 202, [s.n.], p. 637-643, mar 2018.

(16) Prata, Camila Barbieri. **Aspectos do autocontrole de resíduos de avermectinas no abate de bovinos**. 2014. 78f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2014.

(17) CASTRO, N. F.; TAVARES, D. J.; SILVA, R. M.; RIBEIRO, R. V. Avaliação da contaminação em carcaças bovinas por resíduos de avermectina em um frigorífico na cidade de Goiânia/GO. In: Semana de Zootecnia – SEZUS, Goiás. **Anais da Semana de Zootecnia 2016**. Goiás: Universidade Estadual de Goiás, 2016.

(18) SOUZA, S. V. C.; SILVA, G.; DINIZ, M. H. G. M.; SANTOS, E. V.; LIMA, J. A.; TEODORO, J. C. Determinação de resíduos de avermectinas em fígado bovino por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 23, n.1, p. 54-58, jan-abr. 2003.

Enviado: 17/08/2016
Revisado: 20/03/2018
Aceito: 13/08/2018