

Setembro 2010
Revisão: Abril 2013

GUIA TÉCNICO PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS DE
METABOLISMO E CINÉTICA DE RESÍDUOS DE AGENTES
FARMACOLÓGICOS DE USO VETERINÁRIO EM ANIMAIS
PRODUTORES DE ALIMENTOS

ESTUDOS DE ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS PARA
ESTABELECEM PERÍODOS DE CARÊNCIA DO
MEDICAMENTO VETERINÁRIO



Guia nº 1 - G.F.

AUTORES

Participaram na realização deste guia membros das seguintes instituições que fazem parte do grupo ad hoc de Fármacos Veterinários da Fundação PROSAIA:

Relação em ordem alfabética:

Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria

Cámara Argentina de la Industria de Productos Veterinarios (CAPROVE):

Cámara de Laboratorios Argentinos Medicinales Veterinarios (CLAMEVET):

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)

- Divisão de Produtos Veterinários e Alimentos para Animais. Divisão Nacional de Agroquímicos, Produtos Veterinários e Alimentos – SENASA.
- Coordenação de Resíduos Químicos do Departamento de Laboratório Animal - Divisão Geral de Laboratório e Controle Técnico – SENASA.

Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA):

- Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Nacional del Centro de la Provincia de Bs. As. – Tandil.

Universidad Nacional del Litoral (UNL):

- Cadeira de Farmacologia da Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidad Nacional del Litoral.
- Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidad Nacional del Litoral.

Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

- Cadeira de Farmacologia, Faculdade de Ciências Veterinárias e Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nacional de La Plata.

Coordenação do grupo a cargo do Dr. Javier Pardo (Fundação PROSAIA)

Tabela de conteúdos

Prólogo	4
1. Introdução.....	6
1.1 Objetivo do guia	6
1.2 Antecedentes.....	6
2. Alcance	6
3. Glossário	7
4. Estudos de eliminação do resíduo marcador	7
4.1. Medicamento veterinário em avaliação	9
4.2 Animais e criação de animais	9
4.2.1. Estudos intramamários	10
4.2.2. Outros parâmetros	10
4.3. Número de animais para o estudo	10
4.3.1. Ruminantes, suínos e equinos para estudos de resíduos em tecidos	10
4.3.2. Animais leiteiros para estudos de resíduos no leite	10
4.3.3. Aves em cativeiro	11
4.4. Via de administração	11
4.4.1. Guia geral	11
4.4.2. Considerações para medicamentos veterinários para múltiplas vias de administração	11
4.4.3. Recomendações para a aplicação de um medicamento veterinário por aspersão ..	11
4.5. Abate Animal	12
4.6. Amostragem	12
4.6.1. Considerações gerais	12
4.6.2. Locais de injeção	14
4.6.3. Outras considerações	15
4.6.4. Amostragem de leite	16
4.6.5. Amostragem de ovos	16
5. Recomendações para os medicamentos veterinários propostos para períodos de carência de 0 dias	16
6. Estudos de comprovação de período de carência	17
6.1. Critérios para determinar a necessidade de um estudo de resíduos ou de um estudo de comprovação do período de carência	17
6.2. Interpretação dos resultados do estudo de comprovação de período de carência	17
6.3. Desenho experimental	18
7. Método analítico para ensaios de resíduos marcadores	18

Prólogo

PROSAIA: La Seguridad Alimentaria y la producción de medicamentos veterinarios.

“Animales sanos, alimentos sanos, gente sana”.

La Argentina como productora de alimentos de calidad afronta entre otros desafíos el acecho de enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes que, debido a los cambios culturales ocurridos en el mundo en los últimos años, se hallan en continua expansión (BSE, Influenza Aviar, Nipah, West Nile Fever, Rift Valley Fever entre otras). Muchas de estas son zoonosis, lo que ha ocasionado cambios muy profundos en los sistemas de garantías exigidos por las autoridades sanitarias, entre las cuales la seguridad sanitaria de los alimentos es un requisito indispensable. Para alcanzar la seguridad alimentaria de los alimentos es necesario, entre otras condiciones, disponer de medicamentos veterinarios de seguridad y pureza probadas que garanticen, junto con su correcta aplicación, que los productos y subproductos obtenidos de los animales se conviertan en alimentos que no sean causantes de enfermedades por la presencia de contaminantes o agentes patógenos, en forma involuntaria -inocuidad- o deliberada -bioterrorismo- y contribuir así a preservar la salud y protección de los consumidores.

Para eso existen principios fundamentales que se deben tener en cuenta en la formulación de los insumos para los animales de abasto incluidos los alimentos y los medicamentos veterinarios. Estos principios incluyen el control de la fuente, la manipulación de los materiales utilizados y el diseño de un sistema de elaboración adecuado que contemple:

La normativa, recomendaciones y estándares nacionales e internacionales.

Este es un aspecto primordial que deben cumplir todos los medicamentos veterinarios ya que, de no ser así, se corre el riesgo de que los productos y subproductos obtenidos de los animales tratados queden fuera de los mercados.

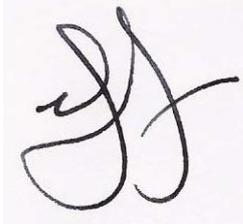
Las Buenas Prácticas de Manufactura.

“Buenas Prácticas de Manufactura es aquella parte del aseguramiento de la calidad que garantiza que los productos sean consistentemente producidos y controlados de acuerdo a los estándares de calidad apropiados al uso al que están destinados y según lo requiera su autorización de comercialización.” WHO Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products.

Por lo tanto, mantenerse y desarrollar un negocio competitivo como proveedores de alimentos dentro de este contexto presupone además cumplir con los requisitos implícitos y explícitos que los consumidores demandan. Entre esos requisitos los atributos de inocuidad involucran la aplicación de sistemas de aseguramiento de la calidad tales como Buenas Prácticas Agrícolas, Buenas Prácticas de Manufactura, HACCP, determinación de niveles o ausencia de residuos, de pesticidas, de antibióticos, garantía de que los medicamentos veterinarios utilizados en el control de las enfermedades de los animales cumplen con las normas internacionales.

Dentro de este marco de referencia y en cumplimiento de los objetivos de su creación, PROSAIA convocó a los principales referentes en la materia del organismo regulador SENASA, la Academia y las cámaras representativas a conformar un Grupo Ad-Hoc para

la Redacción y Actualización de Guías, Protocolos y Normativas para el Correcto Desarrollo de Medicamentos Veterinarios, como un aporte para la adecuación a los tiempos que vivimos.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'CVG', on a light pink background.

Dr. Carlos Van Gelderen

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A. Schudel', on a light pink background.

Dr. Alejandro Schudel

1. Introdução

Como parte do processo de aprovação dos medicamentos veterinários para animais produtores de alimentos, as autoridades reguladoras requerem dados de estudos de eliminação de resíduo marcador, a fim de estabelecer períodos de carência apropriados em produtos comestíveis, incluídos a carne, o leite, os ovos e o mel. O objetivo deste guia é dar recomendações sobre o desenho de estudos que facilitem a aceitação universal dos dados gerados sobre a eliminação de resíduos para cumprir esses requerimentos.

As recomendações gerais estabelecidas podem ser aplicadas à maior parte das situações em que se torna necessário determinar um período de restrição de uso. Contudo, é imprescindível considerar que podem existir situações para as quais resultem inadequadas ou inaplicáveis. Nesses casos, a autoridade sanitária avaliará os desenhos específicos propostos toda vez que estiverem devidamente fundamentados. Esta avaliação deverá ser prévia ao início da experiência.

1.1. Objetivo do guia

Este trabalho, baseado em antecedentes reconhecidos, tem o intuito de propor protocolos para a condução de estudos de eliminação de resíduos a fim de estabelecer períodos de carência de medicamentos veterinários. Os protocolos foram adaptados às características da realidade nos países membros da CAMEVET e podem ser úteis para outros países.

1.2. Antecedentes

VICH GL 48 (November 2009) – Marker Residue Depletion Studies.

EMEA/CVMP/036/95-Final (January 1997). Approach Towards Harmonization of Withdrawal Periods.

2. Alcance

Para registrar um medicamento veterinário destinado a animais produtores de alimentos, são recomendados estudos de eliminação do resíduo marcador na espécie de destino a fim de:

- Demonstrar a eliminação do resíduo marcador depois do fim do tratamento farmacológico até alcançar o nível de segurança permitido (ex. tolerância ou limite máximo de resíduos [LMR]).
- Gerar a devida informação para estabelecer períodos de carência apropriados a fim de assegurar a inoquidade dos alimentos.

A idéia é que um estudo de eliminação de resíduos (para qualquer espécie), realizado dentro de qualquer região do mundo, seja suficiente para satisfazer os requerimentos de informação para estabelecer períodos de carência apropriados de um medicamento específico para animais produtores de alimentos. O guia abrange as espécies mais comuns, isto é, bovinos, suínos, ovinos e aves. No entanto, os princípios deste guia são flexíveis o suficiente para serem aplicados a espécies relacionadas não mencionadas neste grupo (por ex. gado bovino vs ruminantes em geral, frangos vs aves em cativeiro em geral)

Este guia não inclui considerações sobre produtos de aquicultura nem apicultura.

Os estudos devem ser realizados conforme os princípios aplicáveis das Boas Práticas de Laboratório (GLP) e das Boas Práticas Clínicas (BPC)

3. Glossário

Cesta básica de alimentos padrão: É uma estimativa da quantidade total de alimento de origem animal que é consumida diariamente por um adulto de 60 kg. A cesta básica de alimentos utiliza valores arbitrários de consumo baseadas nos percentis superiores da ingestão diária de alimentos de origem animal.

Os valores de consumo diário de alimentos de origem animal são:

Para mamíferos:

300 g de músculo, 50 g de gordura ou gordura e pele, 100 g de fígado e 50 g de rim.

Para aves:

300 g de músculo, 90 g de gordura e pele, 100 g de fígado e 10 g de rim.

Para peixes:

300 g de músculo e pele em proporções naturais

Também, considera-se um consumo de 1,5 l de leite, 100 g de ovos e 20 g de mel.

A estimativa do risco de consumo de resíduos presentes em uma cesta básica de alimentos é feita considerando a IDA.

Princípio ativo – Agente Farmacológico (do inglês API: Active Pharmacological Ingredient): É toda substância que pode ser utilizada para a cura, mitigação, tratamento, prevenção ou diagnóstico das doenças do homem ou dos animais.

Ingestão Diária Aceitável (IDA): É a estimativa do resíduo, expresso em termos de unidades de peso por quilograma de peso vivo (kg/pv), que pode ser ingerido diariamente durante toda a vida, sem risco apreciável para a saúde do consumidor.

Intervalo de confiança: Valores entre os quais se espera achar, com certo grau de certeza, o valor de um parâmetro populacional.

Limite Máximo de Resíduo (LMR): É a máxima concentração permitida de resíduo marcador em um tecido animal (ex. fígado, rim, músculo ou gordura) ou produto animal, que resulta do uso de um medicamento veterinário, expresso em mg/kg (ppm) ou µg/kg (ppb) em relação ao peso fresco, conforme a legislação vigente.

Limite de quantificação (LOQ): É a menor concentração de analito que pode ser quantificada com um nível aceitável de exatidão e precisão.

Limite de detecção (LOD): É a menor concentração de analito a partir da qual é possível demonstrar a presença do mesmo na amostra experimental com um grau aceitável de certeza.

Limites de tolerância: São os valores extremos de uma série de valores (intervalo) entre os quais se espera achar, com certo grau de certeza, uma determinada porcentagem dos indivíduos de uma população determinada.

Medicamento veterinário: Toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada (elaborada) cuja administração se faça de forma individual ou coletiva, direta ou misturada com os alimentos, destinada à prevenção, cura ou tratamento das doenças dos animais.

Período de Carência – Período de Retirada – Restrição de Uso – Período de Supressão: Período de tempo mínimo que deve decorrer entre a última aplicação de um medicamento veterinário a um animal, nas condições normais de emprego, e a obtenção de produtos

alimentícios desse animal, para garantir que tais produtos alimentícios não contenham resíduos em quantidades que superem os limites máximos estabelecidos.

Produto Veterinário (definido segundo CAMEVET): Entende-se por produto veterinário toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada cuja administração, seja individual ou coletiva, diretamente administrada ou misturada com os alimentos ou água de bebida, destinada à prevenção, diagnóstico, cura ou tratamento das doenças dos animais, incluindo aditivos, suplementos, promotores, melhoradores da produção animal, antissépticos, desinfetantes de uso ambiental ou em equipamentos e ectoparasiticidas e qualquer outro produto que, utilizado nos animais e no seu habitat, proteja restaure ou modifique suas funções orgânicas e biológicas. Compreende também os produtos destinados ao embelezamento dos animais.

Resíduo marcador: É um analito confiável para determinar a presença de resíduos de uma determinada droga em um tecido. O resíduo marcador pode ser a molécula mãe ou qualquer um de seus metabolitos, produtos de degradação ou uma combinação de qualquer um destes. O marcador também pode ser um derivado químico de um ou vários dos componentes do resíduo. A relação entre o resíduo marcador e a concentração dos resíduos de interesse nos tecidos comestíveis deve ser conhecida (resíduo marcador/ resíduos de interesse). O LMR reflete a maior concentração permitida do resíduo marcador nos tecidos comestíveis.

Resíduo total: Termo que faz referência à totalidade dos resíduos relacionados. O total de resíduos normalmente inclui todos os resíduos relacionados ao agente farmacológico (molécula mãe junto com seus metabolitos) e, na maior parte dos casos, é idêntica à totalidade de resíduos determinada por estudos de depleção tecidual radiométricos.

A determinação de resíduos totais em tecidos comestíveis, normalmente, não é requerida para medicamentos genéricos, já que o perfil metabólico e a relação molécula mãe/resíduo marcador foram previamente estabelecidos. Nestes casos, o resíduo total nos tecidos comestíveis na cesta básica de alimentos pode ser estimado levando em conta a informação documentada previamente. Os mesmos princípios também podem ser aplicados quando os resíduos de uma molécula com uma atividade biológica específica (resíduos com atividade toxicológica, microbiológica ou farmacológica) devam ser determinados.

Resíduos de importância toxicológica: Para fazer a estimativa de uma exposição baseada em uma IDA toxicológica, o resíduo de interesse é o resíduo de importância toxicológica. Este inclui normalmente todos os compostos relacionados com a molécula (molécula mãe com os metabolitos) e, na maior parte dos casos, é idêntica à totalidade de resíduos determinada por estudos de depleção tecidual radiométricos. Contudo, se for demonstrado que um componente do resíduo ou uma fração da totalidade dos resíduos é toxicologicamente inativo, é possível descontá-la do resíduo total ou de qualquer outra fração de resíduos que não seja biodisponível por via oral ou de metabolitos dos quais já se sabe que são toxicologicamente inativos.

Resíduos de interesse farmacológico: Para fazer a estimativa de uma exposição baseada em uma IDA farmacológica, o resíduo de interesse é o resíduo de importância farmacológica. Normalmente, é considerada a molécula mãe mais qualquer outro resíduo da mesma. Diante da ausência de dados sobre atividade farmacológica dos componentes do resíduo total, admite-se que o total de resíduos apresenta a mesma atividade farmacológica que a molécula mãe.

Resíduos de interesse microbiológico: Para fazer a estimativa da exposição baseada em uma IDA microbiológica, o resíduo de interesse é o que tem importância microbiológica. Na maior parte dos casos, é idêntico aos resíduos que são determinados em ensaios microbiológicos. Diante da ausência de tais dados, pode ser usado o resíduo total ou, alternativamente, a soma dos componentes individuais dos quais já se sabe apresentam atividade microbiológica.

Portanto, admite-se que a atividade microbiológica do resíduo total ou dos metabolitos e/ou produtos de degradação é igual à molécula mãe.

Local da injeção: É uma área do tecido na qual o medicamento veterinário foi injetado. As amostras de tecido obtidas dos locais de injeção para a realização de estudos de resíduos devem ser representativas do que, com probabilidade, será selecionado como tecido comestível nos procedimentos de abate. A amostra de tecidos deverá incluir tecido muscular, tecido conectivo e gordura subcutânea em proporções naturais (o recorte das amostras para eliminar o tecido conectivo e a gordura aderida ao músculo é considerado um procedimento artificial que se afasta da situação real). Os locais de injeção não devem incluir a porção de pele que os cobre, já que a mesma não é requerida para a análise dos resíduos.

Tecido: Todo tecido animal comestível, inclusive músculos e subprodutos (Definições estabelecidas e adotadas pelo Comitê Misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares - JECFA).

4. Estudos de eliminação do resíduo marcador

4.1. Medicamento Veterinário em avaliação

O medicamento veterinário em avaliação utilizado deve ser representativo da formulação comercial. De preferência, deve proceder do material elaborado conforme as boas práticas de manufatura (GMP) (em escala piloto ou em escala comercial). No entanto, as preparações laboratoriais devidamente documentadas também são aceitáveis.

4.2. Animais e crias de animais

Em geral, é possível utilizar só um estudo de eliminação do resíduo marcador (em tecidos) em suínos e aves em cativeiro. No caso dos ruminantes, pode ser aplicado só um estudo para animais produtores de carne e leite. Porém, devido às diferenças na fisiologia de ruminantes e pré-ruminantes, é recomendável o uso de estudos separados quando as espécies alvo abrangem tanto adultos quanto pré-ruminantes. Deve ser realizado um estudo separado para demonstrar o perfil de eliminação de resíduos no leite de animais leiteiros ou nos ovos produzidos por galinhas.

Os animais devem ser saudáveis e, de preferência, não devem ter recebido medicamentos antes. No entanto, é permitido que os animais recebam vacinas e que tenham sido tratados anteriormente com, por exemplo, anti-helmínticos. No último caso, deve ser considerado um período de repouso farmacológico (*wash-out time*) adequado à terapia utilizada no animal antes do início do ensaio atual. Os animais em avaliação devem ser representativos das raças comerciais e da população animal alvo que será tratada. A procedência, o peso, o estado de saúde, a idade e o sexo do animal devem ser informados.

Os animais devem ter o tempo suficiente para se adaptar as condições experimentais e devem ser aplicadas, na medida do possível, as boas práticas clínicas. Os alimentos e a água administrados aos animais devem estar livres de outros fármacos e/ou contaminantes e devem ser asseguradas as condições ambientais adequadas, conforme as práticas de bem-estar animal.

4.2.1. Estudos intramamários

Para os estudos com medicamentos veterinários aplicados por via intramamária, todos os animais devem ter úberes saudáveis, livres do efeito de mastite. Para os estudos de medicamentos utilizados em terapias de secagem ou pré-parto, os animais prenhes com data de

parto prevista devem entrar nas instalações onde será realizado o estudo antes do início do mesmo.

4.2.2. Outros parâmetros

No planejamento e realização dos ensaios devem ser considerados todos os fatores que possam contribuir para a variabilidade dos níveis de resíduos nos produtos de origem animal. O intuito é que esses fatores (por exemplo, as raças animais, a maturidade física) sejam considerados sem a necessidade de aumentar o número de animais recomendado no ponto 4.3. Por exemplo, se um estudo de eliminação de resíduos do leite recomenda 20 animais, todo fator que determine variabilidade deve estar representado nos 20 animais selecionados inicialmente (não serão adicionados mais 20 animais que representem “outros fatores”)

4.3. Número de animais para o estudo

A quantidade de animais utilizados deve ser suficientemente numerosa para permitir uma avaliação significativa dos dados. Do ponto de vista estatístico, recomenda-se reunir dados sobre resíduos de, no mínimo, 16 animais: 4 animais abatidos em 4 intervalos de tempo apropriadamente distribuídos. Pode ser considerado um número maior de animais caso exista a previsão de que a variabilidade biológica será substancial, já que o aumento da quantidade pode contribuir para determinar com maior precisão o período de carência. Não são requeridos, necessariamente, animais controle (não tratados) como parte do estudo de eliminação do resíduo marcador, porém, deve-se contar com uma quantidade suficiente de tecidos alvo para a preparação de padrões na avaliação de métodos analíticos relacionados. A seção a seguir dá recomendações gerais sobre o número de animais que devem ser incluídos no desenho do estudo.

4.3.1. Ruminantes, suínos e equinos para estudos de resíduos em tecidos

Recomenda-se, pelo menos, 4 animais (quantidades iguais de cada sexo, aproximadamente) para cada tempo de abate. O peso corpóreo deve ser conforme a categoria para a qual está indicado o medicamento veterinário. Segundo o exposto na seção 4.2, as vacas leiteiras também podem ser utilizadas para estes estudos de resíduos em tecidos.

4.3.2. Animais leiteiros para estudos de resíduos no leite

Para os estudos com animais em lactância, recomenda-se o uso de, pelo menos, 20 animais selecionados aleatoriamente de um grupo em que todas as etapas da lactância estejam representadas. Devem ser incluídos animais com alta produção ao início da lactância e animais com baixa produção ao final da lactância.

Para os estudos de secagem e terapia pré-parto, recomenda-se, no mínimo, 20 animais. O estudo deve incluir vacas selecionadas aleatoriamente, representativas das práticas leiteiras comerciais.

4.3.3. Aves em cativeiro

Deve ser utilizado um número suficiente de aves para obter, pelo menos, 6 amostras em cada tempo de abate para os estudos de resíduos em tecidos.

Para os estudos de resíduos em ovos, deve ser utilizado um número suficiente de aves para coletar, no mínimo, 10 ou mais ovos em cada ponto do intervalo de tempo.

4.4. Via de Administração

4.4.1. Guia geral

O tratamento de animais deve ser realizado conforme as doses e as indicações que se deseja designar para o medicamento veterinário em processo de aprovação e deve incluir, nos produtos injetáveis, o local e o método de injeção. Nos tratamentos múltiplos, as injeções devem ser aplicadas alternadamente do lado esquerdo e direito do animal.

A dose deve ser a máxima concentração prevista de tratamento e deve ser administrada durante a máxima duração prevista. Para tratamentos prolongados que incluam várias dosagens, se houver dados disponíveis que indiquem que a concentração do princípio ativo (API) atinge um estado estacionário (momento no qual a concentração do princípio ativo no tecido alvo não aumenta nem diminui, porque a sua velocidade de absorção é igual a sua velocidade de eliminação) antes do final do tratamento, a amostragem pode começar a partir desse momento. Os medicamentos veterinários de administração intramamária devem ser aplicados nos quatro quartos de cada vaca.

Para os estudos de secagem e pré-parto, o medicamento veterinário em avaliação deve ser administrado depois da última ordenha (secagem) e respeitando o intervalo até o nascimento do bezerro (geralmente, 60 dias).

4.4.2. Considerações para medicamentos veterinários elaborados para múltiplas vias de administração

Se o medicamento veterinário foi elaborado para ser administrado através de mais de uma via parenteral injetável (intramuscular, subcutânea ou intravenosa), deve-se apresentar um estudo de eliminação do resíduo marcador separadamente para cada via. *[Nota: Se o período de carência é definido claramente pela eliminação de resíduos do local da injeção depois da dose SC (subcutânea) ou IM (intramuscular), não será necessário apresentar um estudo separado de resíduos intravenosos (com a mesma dose), desde que possa ser aplicado o mesmo período de carência que foi aplicado para a via IM ou SC para a via IV].*

4.4.3. Recomendações para a aplicação de um medicamento veterinário por aspersão:

- a- O equipamento de aspersão deverá ser carregado com a mesma quantidade previamente medida do medicamento veterinário preparado e pronto para sua aplicação.
- b- Depois de carregar o equipamento de aspersão, o sistema deverá ser purgado.
- c- Começar a aspersão pela parte dorsal do animal e da cabeça para o rabo. Depois, voltar novamente para a parte craniana pela região baixa contígua, descrevendo assim um percurso que assegure um correto molhado do animal. Este procedimento deverá ser realizado em ambos os lados do animal até o ponto de gotejamento e sempre evitando aplicar produto nos olhos do animal. O ponto de gotejamento é um indicador de que o animal foi corretamente molhado e que, a partir daí, todo o produto que for aplicado não permanecerá sobre o animal, escorrendo para o chão. Este é o parâmetro que normalmente é utilizado para tratar animais em condições de campo e um dos mais apropriados para limitar as variáveis de dosagem que tem este tipo de aplicações.
- d- Se possível, uma vez finalizada a aplicação, será necessário coletar em um copo graduado o produto remanescente do equipamento de aspersão para calcular o volume aplicado. Esse dado deverá ser registrado no “registro de tratamento”.

$$\text{Volume carregado} - \text{Volume remanescente} = \text{Volume aplicado}$$

O volume aplicado deverá ser correlacionado com o peso do animal a fim de determinar com certeza a dose aplicada por animal em termos de miligramas totais e miligramas por quilograma.

4.5. Abate animal

Os animais devem ser abatidos seguindo as normas de bem-estar animal recomendadas pela OIE e utilizando, sempre que possível, procedimentos aplicáveis comercialmente, garantindo o cumprimento dos tempos de dessangramento estabelecidos. A morte com produtos químicos deve ser evitada.

4.6. Amostragem

4.6.1. Considerações Gerais

Depois do abate, deve ser coletada quantidade suficiente de amostras de tecido comestível, recortar o tecido supérfluo, pesar e dividir em porções. Se a análise não puder ser finalizada imediatamente, as amostras devem ser armazenadas adequadamente à espera da análise. Se as amostras forem armazenadas após a coleta, deve ser demonstrada a estabilidade do resíduo durante o tempo de avaliação.

A Tabela 1 indica as amostras recomendadas para serem coletadas no abate.

Tabela 1. Coleta de amostras de animais em um estudo de eliminação do resíduo marcador (Todas as regiões)

Tipo de tecido comestível	Descrição da amostra por espécie	
	Bovinos / Ovinos / Suínos	Aves em cativeiro
Músculo	Músculo da região lombar	Peito
Local de injeção	Centro do tecido muscular ~0,5 kg. 10 cm. diâmetro x 6 cm. de profundidade para IM; 15 cm. diâmetro x 2,5 cm. de profundidade para SC	---
Fígado	Seção transversal de lóbulos	Inteiro
Rim	Composta de ambos os rins	Composta de ambos os rins
Gordura (excluindo suínos)	Omental e/ou perirenal	---

Pele (suínos e aves)	Pele com gordura em proporções naturais	Músculo com pele em proporções naturais.
Leite (ovinos e bovinos)	Leite integral	---
Ovos	---	Limpar a casca, quebrar o ovo. A clara e a gema podem ser misturadas.

Os tecidos que aparecem na Tabela 1 devem ser analisados para o registro em todas as regiões. Contudo, o guia do VICH para realizar “Estudos de metabolismo para determinar a quantidade e indentificar a natureza dos resíduos” recomenda a coleta de tecidos adicionais para quantificar os resíduos totais a fim de responder às necessidades regionais específicas. Os tecidos adicionais sugeridos para as amostras estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2. Tecidos adicionais que devem ser coletados para responder às necessidades regionais no estudo de eliminação de resíduo marcador.

Tipo de tecido comestível	Descrição das amostras por espécie		
	Bovinos / Ovinos / Suínos	Aves em cativeiro	
Estômago muscular	---	Inteiro	
Coração	Seção transversal	Inteiro	
Intestino Delgado	Composto, enxague de conteúdo	---	
Outros órgãos	Composto	Composto	

Caso seja considerada a necessidade, para a finalidade deste guia, será selecionado um dos tecidos adicionais (por espécie) para avaliar o resíduo marcador e responder às necessidades regionais. O tecido adicional escolhido se baseia nos resultados do estudo de resíduo total (TTR, por sua sigla em inglês) e, normalmente, é o tecido adicional com a maior concentração de resíduos ou com a menor taxa de eliminação de resíduos. Por exemplo, se o estudo de TTR indica que o coração dos bovinos tem a taxa de eliminação mais baixa, esse tecido adicional será selecionado para a avaliação no estudo do resíduo marcador, mas não será necessário gerar dados sobre o resíduo marcador do intestino delgado. Da mesma forma, se o estômago muscular das aves em cativeiro tiver a maior concentração de resíduos, não é recomendada a análise do coração das aves.

4.6.2. Locais de injeção

Para preparações parenterais (IM ou SC), devem ser incluídos os dados sobre a eliminação de resíduos do local (ou locais) de injeção. As amostras devem ser coletadas do último local de injeção. No caso de produtos que não requerem múltiplas injeções, o estudo deve estar desenhado de forma que o último local de injeção seja o lado em que o animal recebeu o maior número de injeções. Recomenda-se manter uma distância mínima de 10 centímetros entre locais de injeção a fim de obter uma melhor qualidade de amostra. A extração de amostras do tecido muscular do local de injeção (dos animais grandes) deve estar centrado no ponto de injeção e conforme as recomendações da Tabela 1.

Durante a realização do estudo de resíduos, o local de injeção deverá estar permanentemente marcado, de forma que o mesmo possa ser fácil e corretamente identificado no momento do abate. O medicamento veterinário deverá ser administrado no centro do tecido subjacente e o local da injeção deverá ser extraído imediatamente depois do abate.

A técnica de coleta deve incluir, sempre que possível, o trajeto da agulha, a área na qual o fármaco foi liberado e qualquer área na qual haja reação tecidual.

A fim de assegurar que o método de amostragem descrito foi o adequado para representar a concentração de resíduos, recomenda-se, sempre que possível, coletar de cada local de injeção uma amostra controle de aproximadamente 300g em forma de anel concêntrico à amostra primária.

A coleta de um círculo adicional ou uma amostra da área que rodeia o local de injeção durante a realização de estudos de eliminação de resíduos teciduais é um requerimento da UE, não sendo assim, em geral, em outras regiões.

Sabe-se que nem sempre é possível obter esta segunda amostra, particularmente nas injeções realizadas na região do pescoço, portanto, o tamanho da amostra de tecido da região periférica à amostra primária pode ser reduzido tanto quanto possível. É necessário, no entanto, que esta amostra apresente um tamanho que permita o seu processamento analítico.

Nos produtos injetáveis em que a dose aplicada supere o volume recomendado por local de aplicação, a injeção deverá ser aplicada em mais de um local (ex: Dose IM ou SC de 1 mL/10 kg para um animal de 360 kg onde o volume máximo recomendado é de 20 ml). Neste caso, a amostra do local de injeção deverá ser do local injetado que recebeu o maior volume (o local onde se injetou 20 ml e não o segundo local onde se injetou 16 ml).

Na prática, a obtenção de amostras com o peso exato ao proposto é difícil de realizar, portanto, aceita-se que o peso real possa variar dentro de certos limites a respeito do peso teórico proposto. São consideradas aceitáveis as amostras do centro do local de injeção (amostra primária) que apresentarem um peso que flutue entre 400g a 600g ($500g \pm 20\%$).

Logo depois da remoção do tecido, as amostras do local de injeção coletadas (centro e periferia) deverão ser apropriadamente homogeneizadas antes de realizar a amostragem final (300g) para a determinação dos resíduos e, assim, evitar o processamento analítico de um material potencialmente não homogêneo.

As dimensões e os pesos propostos para as amostras dos tecidos no local de injeção não podem ser aplicados em animais de pequeno tamanho cuja anatomia não permita coletar amostras de 500g.

Sendo assim, não pode ser aplicada a estratégia geral, mas ela deve ser desenhada caso a caso. A técnica de amostragem escolhida e o peso do tecido a ser analisado deverão ser convenientemente justificados. Neste caso, também deverá, sempre que possível, ser coletada uma amostra de tecido periférico ao local de injeção para corroborar a confiabilidade do método analítico utilizado.

Deve-se levar em conta que a concentração de resíduos, determinada a partir de amostras obtidas de animais de pequeno tamanho ou amostras de tecido com um peso e tamanho menor ao proposto neste guia, deverão ser usadas sem correção alguma ou diluição para o cálculo do tempo de carência.

4.6.3. Outras considerações

- Para as formulações que podem deixar resíduos locais, como os medicamentos veterinários de aplicação tópica por derrame (pour on), devem ser coletadas amostras de tecido relevantes (por exemplo, músculos, gordura subcutânea ou pele/gordura do local da aplicação) para a análise (além das amostras especificadas na Tabela 1).
- Para maior clareza, se um ou mais tecidos é analisado como tecido composto, como pele + gordura em proporções naturais (suínos e aves), não é necessário analisar amostras de pele e gordura separadamente.
- As amostras de músculos podem ser obtidas dos músculos esqueléticos que incluam gordura intramuscular em proporções naturais.
- Recomenda-se coletar só um tipo de amostra de gordura (omental para ruminantes e equinos) ou de pele com gordura (suínos e aves em cativeiro)

4.6.4. Amostragem de leite

As amostras de leite devem ser extraídas de todos os animais incluídos no ensaio. A extração deve ser realizada em cada ordenha, distribuídas por intervalos iguais (aproximadamente 12h). As amostras de cada animal estarão compostas de leite dos quatro quartos. Quando o tratamento estiver composto por várias dosagens, as amostras devem ser coletadas logo depois da última dosagem, exceto quando podem qualificar para períodos de carência de 0 dias, em cujo caso as amostras também devem ser coletadas durante o tratamento. Não existe um número padrão de tempos de amostragem. A coleta de leite deve continuar até que os resíduos

estejam abaixo do ponto de referência apropriado (por exemplo, LMR, tolerância, limite de quantificação, etc.) conforme determinado nas propriedades químicas do princípio ativo.

Apesar de estar fora do escopo deste guia, pode ser solicitado ao patrocinador que analise os resíduos nos tecidos dos bezerros que se alimentaram com o leite (incluído o calostro) dos animais adultos tratados (por exemplo, as mães), se esses animais forem destinados ao consumo humano.

4.6.5. Amostragem de ovos

As amostras de ovos devem ser obtidas de 10 ou mais galinhas poedeiras a cada momento em que põem ovos durante o período de medicação e logo depois da última medicação. As amostras devem ser coletadas depois do tempo necessário para que se complete o desenvolvimento da gema do ovo, que é de 12 dias. A clara e a gema do ovo podem ser misturadas para a análise.

5. Recomendações para os medicamentos veterinários propostos para períodos de carência de 0 dias (Estudos de um só ponto de tempo)

Para os medicamentos veterinários administrados em uma ou várias dosagens (por exemplo, diariamente durante 3 a 5 dias) ou para aqueles de uso contínuo em que os resíduos alcançaram um estado estacionário, um estudo de um só ponto de tempo é suficiente para determinar o período de carência de 0 dias, desde que as características de eliminação de resíduos totais do fármaco tenham sido descritas adequadamente. Se esses dados estiverem disponíveis, recomenda-se a realização de um estudo de um só ponto de tempo com o menor número especificado de animais para confirmar a aceitação do período de carência de 0 dias.

- Aves em cativeiro: 12 aves
- Ruminantes e suínos: 6 animais
- Leite: 10 animais

O momento escolhido para o abate para este estudo deve ser determinado conforme as concentrações máximas observadas durante o estudo de eliminação de resíduos totais, um tempo de transporte mínimo (por exemplo, não menor que 3h) e um tempo máximo que continue qualificando para tempo de carência de 0 dias (por exemplo, ≤ 12 h).

O número aumentado em comparação com o recomendado na Seção 4.3 é justificado para um só ponto de tempo. No entanto, para fêmeas em produção de leite para consumo ou industrialização recomenda-se, no mínimo, 10 animais, já que essa quantidade é suficiente para definir a concentração de leite em um só ponto de tempo (0 dias). As concentrações do princípio ativo que se mantêm abaixo do ponto de referência apropriado (por exemplo, LMR, tolerância) serão consideradas para a determinação de um tempo de carência de 0 dias.

Quando a determinação de um tempo de carência de 0 dias é possível, baseando-se em um protocolo de amostra de um só ponto de amostragem (por exemplo, 12 horas), recomenda-se a coleta de amostras adicionais (por exemplo 1-4 ordenhas) para uma avaliação exaustiva do perfil de resíduos, caso não se disponha dessa informação. Visto que os estudos de leite não

requerem o abate final para a coleta de amostras, esta recomendação deve ser respeitada sem exceções.

No caso de galinhas em produção de ovos, poderá ser estabelecido um tempo de carência de zero dias a partir da obtenção de amostras consecutivas abaixo do ponto de referência (Limite Máximo de Resíduos ou tolerância) durante os 12 dias da etapa de coleta de ovos para a sua análise, dadas as condições fisiológicas do processo de ovogênese.

6. Estudos de comprovação de período de carência.

O teste em um único ponto de comprovação é uma prova especial que tem validade técnica, mas circunscrita à comparação dos resultados da eliminação de resíduos com um medicamento veterinário amplamente conhecido e utilizado na prática veterinária e do qual foram previamente registradas formulações semelhantes no país onde é apresentado. Neste estudo, são utilizados menos animais e o resultado só indica se pode ser aplicada a mesma restrição de uso ou não. Este teste somente indica se os resíduos estão iguais ou abaixo do LMR permitido no ponto (no tempo) que foi selecionado para o teste. Praticamente não calcula o período de carência, mas sim confirma um período específico de carência comparado com o do medicamento veterinário já conhecido.

6.1. Critérios para determinar a necessidade de um estudo de resíduos ou de um estudo de comprovação de período de carência.

Os critérios para determinar quais são os medicamentos veterinários que devem ser submetidos a um estudo de resíduos dependerá do tipo de produto (genérico ou semelhante) de que se trate, do (dos) princípio(s) ativo(s) presente(s) e do critério de aplicação que definirá cada autoridade reguladora.

6.2. Interpretação dos resultados do estudo de comprovação de período de carência

- Se o estudo demonstra que os resíduos do medicamento veterinário submetido a ensaio estão abaixo do LMR, a comprovação é aceita.
- Se o estudo demonstra o contrário, isto é, que os resíduos estão acima do LMR, então a teste não é aceito e não se pode utilizar o período estabelecido pelo produto de referência, sendo necessário realizar um estudo completo de eliminação de resíduos.

6.3. Desenho experimental

É preciso especificar a espécie, idade, raça, linha genética, sexo e origem dos animais utilizados. O teste deverá ser realizado com o número mínimo de animais detalhado na tabela abaixo:

Espécie animal/produto	Estado produtivo	Número mínimo
Ruminantes/suínos	Qualquer	6
Vacas leiteiras	Lactância/secagem/pré-parto	10
Aves	Qualquer	10
Coelhos/porquinho da índia	Qualquer	10
Ovos	---	12

O ensaio deverá respeitar as indicações descritas nos pontos 4.2; 4.4; 4.5 e 4.6 deste guia.

7. Método analítico para ensaios de resíduos marcadores

O patrocinador assume a responsabilidade pela apresentação de métodos analíticos validados para a determinação do resíduo marcador em amostras geradas nos estudos de eliminação de resíduos nos tecidos comestíveis e, quando for necessário, no leite, ovos e mel. O/os método(s) devem ser capazes de determinar com confiabilidade as concentrações do resíduo marcador que abrange o ponto de referência apropriado (isto é, LMR / tolerância) para os respectivos tecidos ou produtos. (Vide Guia de Recomendações para Validação de Métodos Analíticos).

Data de vigência

Frequência de revisão

5 anos