

UNIVERSIDADE CESUMAR / UNICESUMAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS LIMPAS

VINICIUS EDUARDO GARGARO SILVA

**ESTUDO SOBRE RESÍDUOS QUÍMICOS DE FLUAZURON NA
PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE VACAS WAGYU**

MARINGÁ
2021

VINICIUS EDUARDO GARGARO SILVA

ESTUDO SOBRE RESÍDUOS QUÍMICOS DE FLUAZURON NA PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE VACAS WAGYU

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas da Universidade Cesumar, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologias Limpas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Márcia Aparecida Andreazzi

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Luiz Bim Cavalieri

MARINGÁ
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

xxxxxx Silva, Vinicius Eduardo Gargaro.
Estudo sobre resíduos químicos de fluazuron na produção embrionária de vacas Wagyu / Vinicius Eduardo Gargaro Silva. – Maringá-PR, 2021.
53 f. ; 30 cm.

Orientador: Márcia Aparecida Andreazzi.
Coorientadora: Fábio Luiz Bim Cavalieri.
Dissertação (mestrado) – UNICESUMAR – Universidade Cesumar,
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas, 2021.

1. aspiração folicular; 2. biotécnicas da reprodução; 3. bovino Wagyu;
4. carrapaticida..
I. Título.

CDD – XXX.XXX

TERMO DE APROVAÇÃO

VINICIUS EDUARDO GARGARO SILVA

ESTUDO SOBRE RESÍDUOS QUÍMICOS DE FLUAZURON NA PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE VACAS WAGYU

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologias Limpas da Universidade Cesumar, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologias Limpas pela Comissão julgadora composta pelos membros:

Prof.^a. Dr.^a. Márcia Aparecida Andreazzi
Orientador / UNICESUMAR.

Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves
Membro interno / UNICESUMAR.

Profa. Dra. Inês Cristina Giometti
Membro externo/ UNOESTE

Maringá, 23 de fevereiro de 2021

'Quero muito dedicar a mim, porque eu não desisti'

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, modalidade Taxa PROSUP/ CAPES, durante todo o período de realização do mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas da Unicesumar pela oportunidade, a todos docentes pelos ensinamentos proporcionados em especial ao meu co-orientador Prof. Dr. Fabio Luiz Bim Cavalieri e ao Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves, por toda a contribuição no desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a minha querida orientadora, Prof^a. Dra. Marcia Ap. Andreazzi, por acreditar no meu trabalho e por me orientar nesses dois anos, minha mãe acadêmica, muito obrigado.

Agradeço a minha querida mãe Ivone de Fatima Gargaro, uma mulher de muita fibra, da qual eu me orgulho muito, sempre me incentivando para que eu pudesse realizar os meus sonhos.

À minha avó Abigail Lopes Gargaro, por ser tão dedicada e caprichosa, por ter me dado amor e cuidados dignos de amor maternal. E sem menos, em memória de meu amado avô Dionizio Henrique Gargaro, não há como descrever a falta que o senhor faz na minha vida, a imagem paternal que carrego até hoje eu meu coração cheio de saudades.

Em memória de minha amada tia Maysa Yara Gargaro, obrigado por sempre me incentivar a acreditar na educação, na ciência e cultura.

Agradeço ao meu irmão, Victor Gargaro, minha cunhada Kellen Gargaro e meu sobrinho Samuel Gargaro e outros membros familiares que foram importantes.

Aos meus amigos que, de diferentes formas, foram muito especiais em minha vida, e que aqui se fazem representados por Reinaldo Sanabri, Robert Hofacre, Han Tran, Wellington Marra, Wesley Benfica, Amanda Christine, Guilherme Junqueira, e a todos outros amigos aqui não nominados, saibam que por vocês compartilho um amor fraternal. Com vocês meus amigos, a vida é melhor e mais feliz.

A Laura P. Mardigan, Tales da Silveira Faria e demais colaboradores do BIOTEC, por todo auxílio prestado na execução deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento a todos vocês.

Agradecimento em memória a todas as vítimas de covid-19 e vítimas de preconceito LGBTQ+.

À banca de avaliação, pela leitura atenta, crítica e por suas colaborações.

"I love not Man the less, but Nature more"
Lord Byron

ESTUDO SOBRE RESÍDUOS QUÍMICOS DE FLUAZURON NA PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE VACAS WAGYU

RESUMO

O Brasil se destaca no cenário mundial de produção de alimentos, sobretudo de alimentos de origem animal, como a carne bovina. Contudo, existe um desafio atual e mundial que é produzir alimentos, no caso, a pecuária, de forma mais sustentável. O uso das biotecnologias da reprodução pode contribuir neste cenário, mas, vários fatores podem comprometer o resultado e o sucesso dessas técnicas, como é o caso de algumas drogas veterinárias, dentre elas, os carrapaticidas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de resíduos químicos de ectoparasitários ou de seus metabólitos no sangue e no líquido folicular e verificar a produção *in vitro* de embriões (PIVE) em vacas da raça Wagyu submetidas a tratamento com carrapaticida. Foram utilizadas 20 fêmeas bovinas adultas de raça Wagyu, doadoras de oócitos, distribuídos em 2 grupos: G1 – animais que não foram submetidos ao controle de ectoparasitas e G2, animais que foram submetidos ao controle de carrapatos com produto à base de fluazuron. Após, todas as vacas foram submetidas à sincronização estral, em quatro momentos durante o experimento, com intervalos de 21 dias. Nos dias D12, D33, D54 e D75 foram realizadas as aspirações do líquido folicular dos folículos dominantes e foram coletadas amostras de sangue para análise da presença de resíduos químicos, empregando CG-EM. No mesmo momento foram coletados os ovócitos para a PIVE. Foram detectados resíduos de fluazuron no plasma dos animais até 54 dias após a aplicação de carrapaticida, porém, não foram detectados resíduos no líquido folicular. Os animais tratados com carrapaticida apresentaram um maior número de oócitos totais e viáveis, contudo a taxa de viabilidade e a taxa de blastocisto foi menor. Sugere-se que mais pesquisas sejam conduzidas, a fim de comprovar os efeitos desta droga sobre os aspectos reprodutivos de vacas doadoras de oócitos, visto que, o mesmo permanece circulante no sangue por muito tempo. Com mais estudos, será possível propor um protocolo mais apropriado de sincronização e coleta de oócitos para animais tratados com carrapaticidas, e assim, contribuir com o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva de bovinos de corte.

Palavras-chave: biotécnicas da reprodução; carrapaticida; fluazuron; produção *in vitro* de embriões.

STUDY ON FLUAZURON CHEMICAL WASTE IN EMBRYARIAN PRODUCTION OF WAGYU COW

ABSTRACT

Brazil stands out in the world scenario of food production, especially of foods of animal origin, such as beef. However, there is a current and global challenge, which is to produce food, in this case, livestock, in a more sustainable way. The use of biotechnologies of reproduction can contribute in this scenario, but, several factors can compromise the result and the success of these techniques, as is the case of some veterinary drugs, among them, carrapacitidas. Thus, the objective of this study was to evaluate the presence of chemical residues of ectoparasites or their metabolites in the blood and in the follicular fluid and to verify the *in vitro* embryo production (IVEP) in Wagyu cows submitted to treatment with ticks. Twenty adult Wagyu bovine females were used, donors of oocytes, distributed in 2 groups: G1 - animals that were not submitted to the control of ectoparasites and G2, animals that were submitted to the control of ticks with fluazuron-based product. Afterwards, all cows were submitted to estrous synchronization, in four moments during the experiment, with intervals of 21 days. On days D12, D33, D54 and D75, aspirations of the follicular fluid from dominant follicles were performed and blood samples were collected for analysis of the presence of chemical residues, using GC-MS. At the same time, oocytes for IVEP were collected. Residues of fluazuron were detected in the animals' plasma up to 54 days after the application of ticks, however, no residues were detected in the follicular fluid. The animals treated with ticks presented a higher number of total and viable oocytes, however the viability rate and the blastocyst rate were lower. It is suggested that more research be conducted in order to prove the effects of this drug on the reproductive aspects of oocyte donor cows, since it remains circulating in the blood for a long time. With further studies, it will be possible to propose a more appropriate protocol for the synchronization and collection of oocytes for animals treated with ticks, and thus contribute to the sustainable development of the beef cattle production chain.

Keywords: biotechniques of reproduction; cattle tick pesticide; fluazuron; *in vitro* embryo production.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	16
2.1. Objetivos gerais	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Cenário mundial e nacional da bovinocultura de corte	17
3.2. Manejo sanitário de rotina empregado na bovinocultura de corte...	18
3.3. Principais formas de controle de endo e ectoparasitos	20
3.4. Resíduos químicos	21
3.5. Biotecnologias da reprodução	24
3.6. Raça bovina Wagyu	25
4. REFERÊNCIAS	27
5. ARTIGO: Fluazuron influencia a produção <i>in vitro</i> de embriões de vacas Wagyu.....	32
Introdução	33
Materiais e Métodos	34
Resultados e discussão	39
Conclusões	43
Referências	44
6. NORMAS DO ARTIGO	47
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
ANEXO	53

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura química e informações sobre o fluazuron	23
Figura 2. Protocolo experimental	35

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Especificações de Limite Máximo Residual (LMR) para fluazuron, de acordo com o Codex <i>Alimentarius</i> (CODEX), a Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos (EMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).....	24
Tabela 2. Concentração plasmática de fluazuron em vacas doadoras da raça Wagyu submetidas a uma dose de 2,5 mg kg ⁻¹ de peso corporal de formulação comercial pour on de fluazuron em função dos dias após a aplicação (µg/ml)	39
Tabela 3. Eficiência média de quatro sessões de ovum pick-up (OPU) e da produção in vitro de embriões em vacas doadoras da raça Wagyu submetidas a uma dose de 2,5 mg kg ⁻¹ de peso corporal de formulação comercial pour on de fluazuron.	42

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil se sobressai no cenário mundial de produção de alimentos, tanto de origem vegetal quanto animal, sendo apontado como celeiro do mundo (SÁ; SILVA, 2019). Dentre os alimentos de origem animal, os produtos cárneos de frango e de boi se destacam. No caso da carne bovina, ressalta-se que o Brasil é detentor do maior rebanho comercial de gado do mundo e ocupa o segundo lugar como maior produtor e exportador de carne, posicionando o país como protagonista no cenário mundial da produção de gado de corte (ABIEC, 2018).

Contudo, um grande desafio atual para a humanidade é ofertar recursos alimentares suficientes para atender às necessidades das pessoas sem, entretanto, exceder a capacidade da Terra, ou seja, produzir alimentos e se desenvolver de forma sustentável (ROCKSTRÖM et al., 2009).

O desenvolvimento sustentável se fundamenta no crescimento econômico, na proteção ao meio ambiente, e na promoção da igualdade social (BOFF, 2017) e, para estimular o desenvolvimento sustentável, a Organização das Nações Unidas (ONU) elaborou um conjunto de 17 objetivos e 169 metas universais, denominados Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) que apresenta como visão um mundo livre da pobreza, fome, doença e penúria, onde toda a vida pode prosperar (UNESCO, 2015). No que tange à produção de alimentos e erradicação da fome, vários ODS enfatizam a importância de áreas como a agricultura e a pecuária, consideradas pontos estratégicos para contribuir com o desenvolvimento sustentável (LEROY et al., 2016).

Dessa forma, um modo de expansão visando uma produção pecuária mais sustentável é o incremento da competitividade por meio da redução de custos da produção e/ou pela oferta de produto de qualidade superior, que poderá resultar em novos mercados, mais lucrativos e exigentes. Nesse contexto, uma importante ferramenta é o uso das biotecnologias da reprodução, que pode contribuir de maneira positiva com a sustentabilidade econômica e ambiental da cadeia bovina (COLOMBO et al., 2017).

Outro ponto importante a ser considerado é o controle sanitário do plantel de gado de corte, visto que garante o desempenho produtivo e reprodutivo dos animais, resultando em ganhos econômicos. De fato, as doenças infectocontagiosas, as endoparasitoses e as ectoparasitoses merecem atenção especial, pois reduzem os índices de desenvolvimento do plantel (BERGE; VERTENTEN, 2017).

No contexto da sanidade animal, um problema comum entre os rebanhos brasileiros são os parasitos, tanto endo como ectoparasitas, os quais exigem um controle constante. No Brasil, por ser um país tropical, um ectoparasita de importância econômica é o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, que é um parasito hematófago, que causa injúrias aos animais e é vetor de doenças como a Tristeza Parasitária Bovina, representando risco a saúde do animal e ao seu bem-estar (CHEFER et al., 2016) .

Para o tratamento de infestações de carrapatos existem, atualmente, várias formas para reduzir sua incidência e interferir no seu ciclo de vida, tais como rotação de pastagens, introdução de pastagens com poder de repelência ou com ação letal ao parasita, produção com animais mais resistentes ao carrapato, além do uso de métodos químicos. Os métodos químicos, que incluem os denominados carrapaticidas, apresentam uma gama de princípios ativos comercialmente conhecidos como o amitraz e as associações de organofosforados com piretróides, piretróides com lactonas macrocíclicas e fluazuron com organofosforados (ROCHA; OLIVEIRA 2006).

Porém, na prática, muitas vezes, os produtores não respeitam as normas de uso dos carrapaticidas, aplicando doses desnecessárias, super ou sub-doses, não respeitam o período de carência e, além disso, verifica-se que o prazo de carência estabelecido pelos fabricantes pode não ser adequado para outras características inerentes à pecuária, como é o caso do uso das biotecnologias da reprodução, evidenciando lacunas do conhecimento nessa área.

Somado a esse fato, ressalta-se que esse problema pode se agravar mais ainda em raças de clima temperado, importadas, que são mais vulneráveis aos carrapatos e, por isso, dependem de um controle de carrapatos mais intensivo (MAPHOLI et al., 2014), como exemplo, a raça Wagyu.

A raça de gado Wagyu, de origem japonesa, tem sido introduzida no Brasil a fim de ampliar o rol de raças criadas e oferecer um produto com qualidade diferenciada, visto que sua carne é reconhecida mundialmente pela maciez, suculência e sabor, características resultantes da carcaça com elevados níveis de marmoreio e da alta quantidade de gordura insaturada (TANINAKA et al., 2015). Sendo assim, fomentar essa criação traz vantagens econômicas para o Brasil.

Por isso, estudos que envolvam a determinação de resíduos químicos de carrapaticidas no sangue e no líquido folicular de vacas da raça Wagyu, uma raça importada e com rebanho crescente no Brasil, poderão contribuir com o estabelecimento de

um protocolo adequado de controle ectoparasitário que não comprometa os resultados das biotecnologias da reprodução empregadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar se os resíduos de carrapaticida interferem na produção *in vitro* de embriões bovinos.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar a presença de fluazuron ou de seus metabólitos nas amostras de líquido folicular e sangue colhidas;
- Avaliar a produção *in vitro* de embriões bovinos de vacas doadoras da raça Wagyu, submetidas ou não a tratamento com carrapaticida, a base de fluazuron;
- Correlacionar os resultados das análises de presença de resíduos químicos à eficiência da *ovum pick-up* (OPU).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Cenário mundial e nacional da bovinocultura de corte

No ano de 2020 o rebanho bovino mundial totalizou mais de 1 bilhão de cabeças, atribuído ao expressivo crescimento da produção nos Estados Unidos, Argentina e Austrália, sendo que o Brasil também se destaca pois é detentor do maior rebanho comercial de gado do mundo e ocupa o primeiro lugar como maior produtor e exportador de carne bovina. O rebanho brasileiro soma um total de 213,6 milhões de cabeças, o que torna o país um protagonista no cenário mundial da produção de gado de corte (ABIEC, 2020; USDA NASS, 2019). O *United State Department of Agriculture National - Agricultural Statistics Service* (USDA NASS) aponta o Brasil e a Índia como os maiores exportadores mundiais de carne bovina e os americanos como os principais importadores (USDA NASS, 2019).

De acordo com o relatório do *Worldwatch Institute* (WI), a produção e o consumo globais de carne tem aumentado, e esse fato se deve, em parte, ao crescimento populacional e a maior demanda *per capita* em muitos países, cuja população tem maior poder de compra (PETROVIC et al., 2015). De fato, os países industrializados consomem o dobro da quantidade de carne quando comparados aos países em desenvolvimento (PETROVIC et al., 2015).

Evidenciando a importância da pecuária no cenário econômico brasileiro, verifica-se que ao final de 2018 o Brasil registrou um crescimento do Produto Interno Bruto (PIB), que chegou a R\$ 6,83 trilhões e, nesse mesmo período, o PIB da pecuária foi de R\$ 597,22 bilhões, 8,3% de superávit comparado ao ano de 2017, portanto o PIB da pecuária aumentou em 8,7% a sua participação no PIB total brasileiro (ABIEC, 2018).

Com relação à distribuição geográfica dos rebanhos bovinos no Brasil, observa-se que o maior número de cabeças de gado se concentra em estados com maior potencial produtor, como Mato Grosso, que ocupa a primeira posição nacional, com 29 milhões de cabeças (BRASIL, 2019). Por outro lado, o Paraná apresenta um rebanho inferior, com 9 milhões de cabeças de gado, ocupando a 10ª posição nacional, contudo, 2,1 milhões de cabeças do estado estão presentes na região noroeste, fato que torna essa cadeia produtiva muito importante para a economia da região (IPARDES, 2018).

3.2. Manejo sanitário de rotina empregado na bovinocultura de corte

Para garantir o crescimento e a qualidade dos rebanhos brasileiros, o manejo sanitário é primordial. O controle da sanidade do plantel de gado de corte garante o desempenho produtivo e reprodutivo dos animais, resultando em ganhos econômicos.

Os programas sanitários são definidos como um conjunto de ações desenvolvidas com o objetivo de promover e manter a saúde animal, ou seja, são várias ações que promovem ou preservam a saúde animal, a fim de se alcançar resultados quantitativos positivos na produção de carne ou leite, melhorando a eficiência financeira das cadeias produtivas (ALFIERI et al., 2019).

O controle de doenças infectocontagiosas, como brucelose, leptospirose, tricomonose, campilobacteriose, rinotraqueite infecciosa (IBR), diarreia viral bovina (BVD), endoparasitoses e ectoparasitoses merecem atenção especial pois reduzem os índices de desenvolvimento do plantel (BERGE; VERTENTEN, 2017). Nesse panorama, as vacinas são consideradas como uma das principais ações a serem implementadas em um programa sanitário para a prevenção de patologias.

O controle de endo e ectoparasitas também se constituem em pontos consideráveis no manejo sanitário, em função dos prejuízos econômicos acarretados. O Brasil, por ser um país de clima tropical, apresenta elevados impactos negativos do parasitismo sobre a produtividade do rebanho bovino. Grisi et al. (2014) elencaramas perdas na produção de leite e no ganho de peso dos animais para os principais parasitos, sendo, para nematóides gastrointestinais, perdas de US\$ 7,11 bilhões, para *Boophilus microplus*, US\$ 3,24 bilhões, para *Haematobia irritans*, US\$ 2,56 bilhões, para *Dermatobia hominis*, US\$0,38 bilhões, para *Cochliomyia hominivorax*, US\$ 0,34 bilhões e para *Stomoxys calcitrans*, US\$ 0,34 bilhões, totalizando US\$ 13,96 bilhões de prejuízo. Outros ectoparasitas, como a sarna e os piolhos também foram apontados pelo autor, já que o clima tropical propicia a presença destes parasitos durante o ano todo. A USDA estimou perdas anuais de US\$ 29,7 milhões para sarna e ácaros da sarna e de US\$ 730,3 milhões para moscas de chifre (USDA NASS, 2011).

O endoparasitismo em bovinos pode ser dividido em três categorias no que se refere ao efeito dos parasitos no hospedeiro: infectado, econômico e clínico. A categoria infectado se refere a presença de parasitos, mas, devido aos números e/ou composição de espécies de parasitos não existem efeitos adversos demonstráveis, ou seja, existe um equilíbrio entre hospedeiro e parasito. O parasitismo econômico é o nível de infecção que

impede que o hospedeiro atinja sua genética potencial na produção de carne ou leite; é um parasitismo sazonal e, frequentemente, é afetado por outros fatores com alimentação, taxa de lotação, idade, sexo, raça ou resistência. O parasitismo clínico ocorre quando um existe um desequilíbrio entre hospedeiro e parasito, resultando em sinais clínicos de infestação parasitária (CHARLIER et al., 2009).

Os endoparasitas constituem um grupo de preocupação constante no controle sanitário e, dentre elas, as endoparasitoses gastrintestinais representam relevante importância zootécnica. As parasitoses gastrintestinais apresentam grande disseminação na pecuária brasileira, prejudicando o desempenho dos bovinos, pois gera competição pela absorção de nutrientes e ocasiona espoliação do hospedeiro. Diferentemente dos ectoparasitas, as parasitoses gastrintestinais não são percebidas visualmente pelos produtores, dificultando o diagnóstico e a avaliação da carga parasitária, por isso, essas endoparasitoses geralmente se apresentam de forma crônica e com baixa mortalidade, contudo, reduzem o desenvolvimento e a produção dos animais (VENTURINI, 2016).

Os ectoparasitas são parasitos que vivem na superfície, ou em alguma lesão com contato ao meio externo do hospedeiro, que se alimentam à custa do animal parasitado, causando impacto negativo ou prejuízo em função de algum tipo de ação mecânica e patogênica (GALVÃO; GURGEL-GONÇALVES, 2014). No caso das ectoparasitoses, um ectoparasita de grande importância no Brasil é o carrapato, que é um parasita hematófago, que além de causar injúrias ao animal pode ser vetor de doenças como a Tristeza Parasitária Bovina (CHEFER et al., 2016).

Para seu controle, medidas profiláticas devem fazer parte do manejo de rotina da propriedade, como disponibilizar alimento e água de boa qualidade para os animais, limpar periodicamente os cochos, realizar a limpeza de currais e esterqueiras, roçar o pasto e eliminar corretamente as carcaças, para que os animais respondam adequadamente às vacinas e às demais medidas profiláticas (OLIVEIRA; MOURA ZANINE; SANTOS, 2007). Salienta-se que esses parasitos devem ser controlados, principalmente, nos períodos do ano em que ocorre maior frequência, como na estação chuvosa, quando suas populações aumentam nas pastagens e os animais se tornam parasitados. Destaca-se também, que em rebanhos de raças europeias ou em seus cruzamentos, os prejuízos provocados pelos ectoparasitas podem ser maiores (STOTZER et al., 2014).

3.3. Principais formas de controle de endoparasitas e ectoparasitas

Para controlar as parasitoses, métodos químicos, biológicos e de manejo têm sido utilizados (CARDOSO et al., 2014), sendo que o mais comum é o uso de produtos químicos, contudo, ressalta-se que a utilização deve ser criteriosa e deve ser elaborado um plano de controle estratégico de acordo com a sazonalidade dos parasitas, de modo a evitar excesso na aplicação do produto químico e a existência de resíduos na carne ou no leite. Outra consequência do uso excessivo é o desenvolvimento de resistência dos parasitos ao princípio ativo do produto (MAIORANO et al., 2019).

Um dos principais ectoparasitas que prejudica a pecuária é o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, e existem várias formas para reduzir sua incidência e interferir no seu ciclo de vida, tais como realizar rotação de pastagens, introduzir pastagens com poder de repelência com ação letal ao parasita e, no caso do Brasil, os pecuaristas também buscam bovinos de raças mais resistentes (SHYMA; GUPTA; SINGH, 2015), além do uso de métodos químicos, como o uso de carrapaticidas.

Globalmente, o controle químico tem sido a principal estratégia para combater infestações de carrapatos em bovinos, principalmente em países com introdução de raças importadas, as quais são mais suscetíveis aos carrapatos e, por isso, dependem do controle intensivo usando carrapaticidas (MAPHOLI et al., 2014). Entretanto, o uso regular de carrapaticidas eleva os custos de produção, em função do aumento dos custos veterinários, aumenta a mão de obra no manejo dos rebanhos e pode resultar em resistência dos carrapatos aos carrapaticidas (JONSSON, 2006).

Em pequenas propriedades, os pecuaristas usam tratamentos menos onerosos, como a remoção manual, uso de desinfetantes domésticos ou mesmo o uso de fluido de motor ou óleo de carro para controlar carrapatos, porém, essas práticas não são desejáveis e podem prejudicar a saúde animal e humana (MOYO; MASIKA, 2009). Com relação à resistência, sabe-se que um dos maiores problema do uso de carrapaticidas é a seleção de carrapatos resistentes aos princípios ativos. O mecanismo de resistência do carrapato é complexo e está relacionado à imunologia do hospedeiro, podendo ser classificado como resistência inata, que está relacionada à produção de substâncias antimicrobianas na superfície do tecido epitelial, ocasionada pelo primeiro contato do agente com o hospedeiro na primeira infestação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014), e resistência adquirida, em que a imunidade é efetuada pelos anticorpos, sendo ocasionada pela grande exposição do animal à infestação de carrapatos (TIZARD, 2014).

Os compostos químicos utilizados como carrapaticidas mais conhecidos comercialmente são o amitraz e as associações de organofosforados com piretróides, piretróides e lactonas macrocíclicas e fluazuron e organofosforados (ROCHA; OLIVEIRA 2006).

Além do maior custo de produção, maior manejo e resistência ao princípio ativo, os carrapaticidas também podem deixar resíduos químicos na carne, no leite, no couro e no meio ambiente, daí a necessidade do cumprimento das normas corretas de aplicação, envolvendo forma, dose e respeito ao período de carência, de acordo com a prescrição do produto. Inclusive, existe uma demanda pública crescente para produtos de origem animal sem resíduos (MACHADO et al., 2010).

Porém, observa-se, na prática, que em muitas vezes, os produtores não respeitam essas normas, aplicando doses desnecessárias, quantidades maiores de produtos ou não respeitam o período de carência e, ao mesmo tempo, verifica-se que o prazo de carência estabelecido pelo fabricante pode não ser adequado para outras características inerentes à pecuária, como é o caso do uso das biotécnicas da reprodução, evidenciando lacunas do conhecimento nessa área.

3.4. Resíduos químicos

Vários compostos químicos são usados regularmente para tratar os animais acometidos por várias patologias ou no controle sanitário de rotina, incluindo os rebanhos bovinos. Contudo, se não forem respeitados, dentre outros fatores, a dose e o tempo de carência para a completa eliminação do composto do sistema corporal do animal, alguns resíduos desses compostos poderão ser encontrados na carne ou no leite (BEYENE; TESEGA, 2014).

A União Europeia (UE) e o Centro de Medicina Veterinária da *Food and Drug Administration* (CVM/FDA) nos EUA definem resíduos como substâncias farmacologicamente ativas, podendo ser o princípio ativo ou seus metabólitos que permanecem nos alimentos de origem animal. Em condições fisiológicas normais, após administração de um medicamento em um animal, o mesmo é metabolizado em compostos menos tóxicos e, em geral, a maior parte do princípio ativo ou de seus metabólitos é excretada na urina e, em menor grau, pelas fezes. No entanto, em alguns casos, essas substâncias também podem ser encontradas no leite e na carne (BEYENE; TESEGA, 2014).

Resíduos de medicamentos veterinários se constituem em um problema atual. Beyene e Tesega (2014) apontam que os principais fatores de risco responsáveis pelo aparecimento de resíduos podem ser a idade do animal, dieta, presença de patologias, farmacocinética de drogas utilizadas, uso errôneo de doses, não respeito ao período de carência, resistência a fármacos e reações de hipersensibilidade. Complementando, Okocha et al. (2018) afirmaram que mesmo com as orientações dos rótulos dos fabricantes, muitos produtores não seguem as instruções ou as dosagens recomendadas do rótulo, não aderem ao tempo de carência recomendado, administram um volume muito grande em um único local de injeção, usam equipamentos contaminados por outras drogas, ou não limpam corretamente o equipamento usado para misturar ou administrar drogas, erram na dosagem, medição ou misturam diferentes medicações e permitem que os animais acessem produtos químicos derramados ou alimentos medicamentosos.

No controle sanitário de ectoparasitas é comum o uso de compostos químicos, denominados carrapaticidas, sendo que os mais conhecidos comercialmente são o amitraz e as associações de organofosforados com piretróides, piretróides e lactonas macrocíclicas e fluazuron e organofosforados (ROCHA; OLIVEIRA 2006).

O fluazuron, da classe difluoro-benzamida (Figura 1), um carrapaticida que atua de forma sistêmica, regula o crescimento do carrapato, agindo de forma a inibir a incorporação de quitina na cutícula. Essa molécula foi lançada comercialmente no mercado em 1994 e, até o ano de 2014, era considerada a única molécula com ingredientes ativos sem nenhuma evidência de resistência (RECK et al., 2014).

Os produtos comerciais a base de fluazuron permitem um controle eficaz dos carrapatos e reduzem a infestação do ambiente, impedindo que surjam novas larvas na pastagem, contudo, apresentam como período de carência para o abate de bovinos, 45 dias após a última aplicação e, para vacas de leite, o produto não deve ser aplicado em fêmeas produtoras de leite para o consumo humano (ZOETIS, 2020).

Considerando que o Brasil é um dos maiores exportadores agropecuário em nível mundial, o país se tornou também um dos maiores consumidores de agrotóxicos (HERMIDA, PELAEZ; SILVA, 2015). Por isso, várias agências estão envolvidas na determinação dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) nos alimentos, como o Codex Alimentarius (CODEX), a Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos (EMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

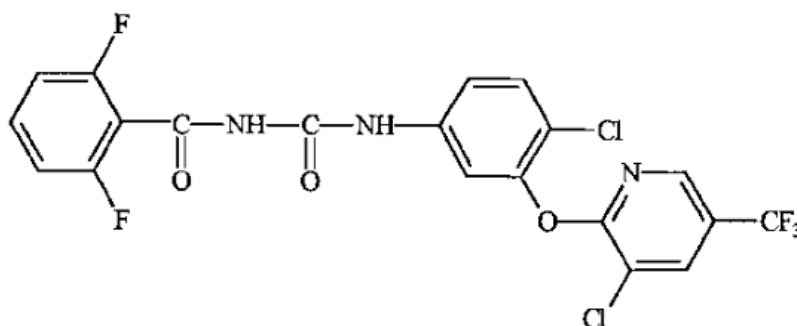
Figura 1. Estrutura química e informações sobre o fluazuron

Nome químico:

IUPAC: 3- [3- (3-cloro-5-trifluorometil-2-piridiniloxi) -4-clorofenil] -1- (2,6-difluorobenzoil) -ureia

CA: N- (3- (3-cloro-5-trifluorometil-2-piridiniloxi) -4-clorofenil) -1- (2,6-difluorobenzoil) -ureia

Sinônimos: Fluazuron



Fórmula estrutural:

Fórmula molecular: C₂₀ H₁₀ Cl₂ F₅ N₃ O₃

Peso molecular: 506,21

OUTRAS INFORMAÇÕES SOBRE IDENTIDADE E PROPRIEDADES

Ingrediente ativo puro:

Aparência: Pó cristalino fino branco a rosa, estado físico a 20 ° C - cristalino, incolor e inodoro

Ponto de fusão: 219 ° C

Fonte: FAO (2021)

No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio da ANVISA estabelece o LMR de agrotóxicos, medicamentos veterinários, contaminantes e aditivos nos alimentos. No entanto, para medicamentos veterinários, os níveis nacionais ainda não foram totalmente definidos e, portanto, vem-se utilizando no Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal, da Instrução Normativa/MAPA N°42, de 20 de dezembro de 1999, e os níveis obtidos de referências internacionais como Mercosul, Codex Alimentarius, FDA/USA e União Européia (ANVISA, 2021).

O Codex Alimentarius, que é uma Comissão conjunta da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), atua como órgão harmonizador de normas e técnicas internacionais pela OMC. O Codex determina LMR de agrotóxicos nos produtos de origem animal ou vegetal destinados ao consumo. No entanto, suas decisões têm apenas um caráter consultivo e não deliberativo (HERMIDA, PELAEZ; SILVA, 2015).

Apesar do elevado grau de assimetria e subjetividade presente nos critérios de decisão adotados, tanto pelos países quanto pelos comitês de especialistas observa-se que, com relação ao fluazuron, os LMR apresentados pelas agências são semelhantes (Tabela 1).

Tabela 1. Especificações de Limite Máximo Residual (LMR) para fluazuron, de acordo com o Codex *Alimentarius* (CODEX), a Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos (EMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Analito	Matriz	LMR Codex (µg/kg)	LMR EMA (µg/kg)	LMR ANVISA (µg/kg)
Fluazuron	Músculo	200	200	-
	Fígado	500	500	-
	Rim	500	500	500
	Gordura	7.000	7.000	7.000
	Leite	200	200	200

Fonte: elaborado pelo autor.

3.5. Biotecnologias da reprodução

Na pecuária, as biotecnologias vêm sendo utilizadas na nutrição, saúde animal, erradicação de doenças, aceleração da seleção genética e controle da reprodução (GUSMÃO; SILVA; MEDEIROS, 2017). De fato, o surgimento e desenvolvimento das biotecnologias reprodutivas foram impulsionados pelo ganho econômico decorrente do uso mais amplo de genética superior (MOORE; HASLER, 2017).

Nos últimos anos, as técnicas de reprodução animal estão sendo utilizadas para aumentar a produção de espécies de animais domésticos, e foram divididas em quatro gerações: a 1ª geração compreende a Inseminação Artificial (IA), a criopreservação de gametas e embriões; a 2ª geração inclui a Superovulação (SOV), a Transferência de embriões (TE) e a ultrassonografia (US); a 3ª geração abrange a sexagem espermática e embrionária, aspiração folicular *in vivo* (Ovum *pick up* - OPU) e Fertilização *in vitro* (FIV) e na 4ª geração encontra-se a clonagem de embriões por transferência nuclear de células somáticas ou embrionárias, transgenia e biologia de células-tronco (BERTOLINI; BERTOLINI, 2009).

Dentre essas técnicas, as que mais se destacam são FIV e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) que tem permitido a disseminação de embriões de alta qualidade, desempenhando um papel importante no melhoramento genético dos rebanhos (BLONDINI et al., 2012; VIEIRA, 2012; GUSMÃO; SILVA; MEDEIROS, 2017).

A produção *in vivo* e *in vitro* foram apontados como as biotecnologias mais relevantes em bovinos devido aos ganhos genéticos e produtivos nos rebanhos. Estas biotecnologias reprodutivas associadas aos programas de melhoramento genético surgiram

como uma ferramenta estratégica capaz de impulsionar a produção animal, resultando na seleção genética, redução do intervalo entre gerações e melhoria na produtividade do rebanho (BLONDIN et al., 2012).

A PIVE é uma técnica em expansão que oferece amplas aplicações em escala comercial. Entretanto, existem desafios a serem superados, como garantir a obtenção de oócitos de boa qualidade, capazes de completar a maturação e que resultem em uma progênie saudável. A implantação bem-sucedida de um programa de PIVE depende de diversos fatores, como a genética do animal, o número de folículos presentes e a composição do líquido folicular (LF), que pode afetar diretamente a qualidade do oócito aspirado (BLONDIN et al., 2012).

O LF possui uma variedade de funções relacionadas ao oócito incluindo a manutenção da parada meiótica, proteção contra proteólise, extrusão durante a ovulação e proteção contra influências hemáticas adversas (SOHEL; CINAR, 2014).

Baseado na importância fisiológica do LF, e no fato de que resíduos de medicamentos veterinários se acumulam, principalmente, no fígado ou nos rins, mas que também podem ser encontrados em outros tecidos, pesquisas que avaliem a presença de resíduos químicos de carrapaticidas ou de seus metabólitos no LF e associem com a eficiência da OPU, são fundamentais para a elaboração de um protocolo seguro e adequado de sincronização e coleta de oócitos em animais tratados com carrapaticidas à base de fluazuron, sobretudo em raças importadas, como é o caso da raça Wagyu.

3.6. Raça Wagyu

A raça Wagyu ou gado japonês chegou ao Japão vinda da Península Coreana no século II com o intuito de se obter sinergia entre a pecuária e o cultivo de arroz. Contudo, após a Segunda Guerra Mundial, o uso desses animais de tração foi substituído pelos maquinários agrícolas, assim, a criação de bovinos Wagyu se tornou exclusiva para a produção de carne (SMITH, 2015; GOTOH et al., 2018).

No Japão, o manejo desses animais é similar aos sistemas intensivos, contudo, também são praticadas técnicas diferenciadas, como o uso de massagens e a adição de cerveja ou saquê nas dietas, buscando melhorar ainda mais a qualidade da carne (GOTOH et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017), visto que a raça Wagyu destaca-se por apresentar um alto nível de marmoreio intramuscular, o que torna a carne macia, suculenta, saborosa, se destacando na gastronomia internacional (GOTOH et al., 2018).

Segundo Bethlem, Palamim e Lima (2014), os primeiros animais da raça Wagyu chegaram ao Brasil no ano de 1992 e desde então, o número de criadores tem aumentado, assim como a participação da carne no mercado gourmet. Além das características relacionadas à qualidade da carne, a raça Wagyu também apresenta características reprodutivas positivas. Zanella (2018) observou em bovinos da Raça Wagyu criados à campo, que tanto machos como fêmeas atingem a puberdade mais precocemente do que as raças europeias. Além disso, os machos apresentam níveis mais altos de testosterona, maior produção espermática e maior libido, apesar da menor circunferência escrotal. Já as fêmeas apresentam maior facilidade no parto, reduzindo a incidência de partos distócicos, precocidade sexual, boa habilidade materna e longevidade.

Entretanto, conforme mencionado anteriormente, a criação de animais da raça Wagyu no Brasil demanda um emprego mais frequente de carrapaticidas quando comparado com outras raças, assim, mais pesquisas devem ser conduzidas a fim de comprovar as características reprodutivas dessa raça, sobretudo nas condições de criação no Brasil, estudando possíveis interferências, como o caso dos resíduos de carrapaticidas, no uso das biotecnologias da reprodução, e assim fomentar sua importância no cenário da produção de alimentos de origem animal.

4. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology E-book**. Elsevier Health Sciences, 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Grupo de Trabalho sobre Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos, 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/219401Med+Vet_Documento+base+discussa~o+18.10/69d161b5-785c-4907-862c-> Acesso em: 18 abri. 2021.

ALFIERI, A. A.; LEME, R. R.; AGNOL, A. M. D. et al. Sanitary program to reduce embryonic mortality associated with infectious diseases in cattle. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p.386-393, 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES ABIEC – Perfil da Pecuária no Brasil. Relatório Anual, 2018, São Paulo: **ABIEC**, 2018.

BERGE, A. C; VERTENTEN, G. Whitepaper: The importance of preventive health and vaccination programmes in ruminant production. 2017. Disponível em: <<https://www.timetovaccinate.com/>>. Acesso em 18 de jan. de 2021.

BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L.R. Advances in reproductive technologies in cattle from artificial insemination to cloning. **Revista de Medicina Veterinária e de Zootecnia**. v.56, p. 184-94, 2009.

BETHLEM, I. V.; PALAMIM, L.; LIMA, R. A. S. A inserção da raça Wagyu no mercado brasileiro de carnes. **Animal Business Brazil**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 6-8, 2014.

BEYENE, T.; TESEGA, B. Rational veterinary drug use: Its significance in public health. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v. 6, n. 12, p. 302-308, 2014.

BLONDIN, P.; VIGNEAULT, C.; NIVET, A. L. et al. Improving oocyte quality in cows and heifers - What have we learned so far? **Animal Reproduction**, v.9, n. 3, p. 281-289, 2012.

BOFF, L. Sustentabilidade: O que é e o que não é. Petrópolis, Rj: Vozes, p.224. 2017.

BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. 2009. Manual de Legislação. Programas nacionais de saúde animal do Brasil/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2009.

BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Valor Bruto da Produção Agropecuária (VBP). 2019. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/valor-da-producao-agropecuaria-para-2019-sobe-para-r-606-2-bilhoes>>. Acesso em 17 abri. 2021.

BRASIL- Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 51, DE 19 DE DEZEMBRO DE 2019, Estabelece a lista de limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Disponível em <https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-51-de-19-de-dezembro-de-2019-235414514>, Acesso em 17 abri. 2021.

CARDOSO, C. P.; SILVA, B. F.; GONÇALVES, D. S. et al. Resistance against ectoparasites in CriouloLageano and crossbred Angus cattle in southern Brazil under natural conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 141-146, 2014.

CHARLIER, J.; HOGLUND, J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. et al. Gastrointestinal nematode infections in adult dairy cattle: impact on production, diagnosis and control. **Veterinary parasitology**, v. 164, n. 1, p. 70-79, 2009.

CHEFER, D. M.; SOUZA, D. M. Bovinocultura de corte: principais manejos durante a fase de cria. **Revista Iniciar**, v. 1, n. 1, 2016.

COLOMBO, A. H. B.; CAVALIERI, F. L. B.; ANDREAZZI, M. A. et al. Avaliação de biotécnicas da reprodução sob o foco ambiental. **Archives of Veterinary Science**, v. 22, n. 1, 2017.

GALVÃO, C.; GURGEL-GONÇALVES, R. Vetores conhecidos no Brasil. GALVÃO C, **Organizador. Vetores da Doença de Chagas no Brasil. Sociedade Brasileira de Zoologia, Série Zoologia: guias e manuais de identificação. Curitiba, Brasil**, p. 88-170, 2014.

GOTOH, T.; TAKAHASHI, H.; NISHIMURA, T. et al.. Meat produced by Japanese Black cattle and Wagyu. **Animal Frontiers**, v. 4, n. 4, p. 46-54, 2014.

GOTOH, T.; NISHIMURA, T.; KUCHIDA, K. et al. The Japanese Wagyu beef industry: current situation and future prospects – a review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v. 31, n. 7, p. 933, 2018.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. D. S. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GUSMÃO, A. O. M.; SILVA, A. R.; MEDEIROS, M. O. A biotecnologia e os avanços da sociedade. **Biodiversidade**. v. 16, n. 1, p. 1-20, 2017.

HERMIDA, C.; PELAEZ V.; SILVA L. Limites de resíduos de agrotóxicos e barreiras técnicas comerciais. **Agroalimentaria** (Caracas), v. 21, p. 1-20, 2015.

INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO SOCIAL-IPARDES - PARANÁ. Perfil do Noroeste Paranaense, 2018. Disponível em: <http://www.ipardes.gov.br/perfil_municipal/MontaPerfil.php?codlocal=701&btOk=ok>. Acesso em 17 abri. 2021.

- JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 1-10, 2006.
- LEROY, G.; BAUMUNG, R.; BOETTCHER, P. et al. Sustainability of crossbreeding in developing countries; definitely not like crossing a meadow. **Animal**, v. 10, n. 2, p. 262-273, 2016.
- MACHADO, M. A.; AZEVEDO, A. L. S.; TEODORO, R. L. et al. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* × *Bos indicus*). **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 280, 2010.
- MAIORANO, A. M.; GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, M. C. S. et al. Resistance to the tick *Rhipicephalus microplus* and *Babesia bovis* infection levels in beef heifers raised in an endemic area of Sao Paulo state, Brazil. **Animal Production Science**, v. 59, n. 5, p. 938-944, 2019.
- MAPHOLI, N. O.; MARUFU, M. C., MAIWASHE, A. et al. Towards a genomics approach to tick (Acari: Ixodidae) control in cattle: a review. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 5, p. 475-483, 2014.
- MOORE, S. G.; HASLER, J. F. A 100-year review: reproductive technologies in dairy science. **Journal of dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10314-10331, 2017.
- MOYO, B.; MASIKA, P. J. Tick control methods used by resource-limited farmers and the effect of ticks on cattle in rural areas of the Eastern Cape Province, South Africa. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, n. 4, p. 517-523, 2009.
- OKOCHA, R. C.; OLATOYE, I. O.; ADEDEJI, O. B. Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture. **Public health reviews**, v. 39, n. 1, p. 1-22, 2018.
- OLIVEIRA, J. S.; MOURA ZANINE, A.; SANTOS, E. M.. Fisiologia, manejo e alimentação de bezerros de corte. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 10, n. 1, 2007.
- OLIVEIRA, F.; FREIRES, L.; NEVES NETO, J. T. et al. cadeia produtiva da carne bovina no Brasil. **Revista Interação Interdisciplinar** v. 01, n. 01, p.229-244, 2017.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA – FAO. Disponível em <<http://www.fao.org/3/W8338E/w8338e09.htm>> acesso em 20 jan 2021.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO A CIÊNCIA E A CULTURA - UNESCO – Agenda de Desenvolvimento pós-2015 - UNESCO e os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Disponível em <<http://www.unesco.org/new/pt/brasilia/post-2015-development-agenda/>>, acesso em 20 jan 2021.

PETROVIC, Z.; DJORDJEVIC, V.; MILICEVIC, D. et al. Meat production and consumption: Environmental consequences. **Procedia Food Science**, v. 5, p. 235-238, 2015.

RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A. et al. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1-2, p. 128-136, 2014.

ROCHA, C. M. B. M.; OLIVEIRA, P. R. Percepção dos produtores de leite do município de Passos, MG, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae), 2001. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1235-1242, 2006.

ROCKSTRÖM, J.; STEFFEN, W.; NOONE, K. et al. A safe operating space for humanity. **Nature**, v. 461, n. 7263, p. 472-475, 2009.

SA, D. M.; SILVA, A. F. C. Amazônia brasileira, celeiro do mundo: ciência, agricultura e ecologia no instituto agrônomo do norte nos anos 1940 e 1950. **Revista de História**, n. 178, a05918, 2019.

SHYMA, K. P.; GUPTA, J. P.; SINGH, V. Breeding strategies for tick resistance in tropical cattle: a sustainable approach for tick control. **Journal of parasitic diseases**, v. 39, n.1, p.1-6, 2015.

SMITH, S. B. The Production of High-Quality Beef with Wagyu Cattle. **Production of wagyu beef**. p. 1-26. 2015.

SOHEL, M. M. H.; CINAR, M. U. Advancement in Molecular Genetics to understand the molecular reproduction of Livestock follicular development. **Research in Agriculture Livestock and Fisheries**, v. 1, n. 1, p. 47-60, 2014.

STOTZER, E. S.; LOPES, L. B.; ECKSTEIN, C. et al. Impacto econômico das doenças parasitárias na pecuária. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 3, p. 198-221, 2014.

TANINAKA, T.; BERNARDINO, T.; MENEGHINI, R. et al. Análise da viabilidade econômica de um rebanho de gado de corte da raça Wagyu em ciclo completo. **Revista iPecege**, v. 1, n. 2, p. 44-58, 2015.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 5. ed. São Paulo: Roca, 2014.

UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE - NATIONAL AGRICULTURAL STATISTICS SERVICE (USDA NASS). 2011. Cattle inventory: executive briefing. 2011. Disponível em: <http://www.nass.usda.gov/Newsroom/Executive_Briefings/2011/07_22_2011.pdf>. Acesso em 20 jan de 2021.

UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE - NATIONAL AGRICULTURAL STATISTICS SERVICE (USDA NASS). "2019 State Agriculture Overview." Disponível em: <https://www.nass.usda.gov/Publications/Todays_Reports/reports/cat10219.pdf>. Acesso em 18 de abri. de 2021.

VENTURINI, T. Parasitismo na bovinocultura de corte. **Técnicas de manejo agropecuário sustentável**, p. 115, 2016.

VIEIRA, R. J. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: generalidades. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 55-65, 2012.

ZANELLA, R. Raça Wagyu. Portal do Agronegócio. Disponível em <<http://ruralpecuaria.com.br/tecnologia-e-manejo/racas-gado-de-corte/raca-wagyu.html>> acessado em 20/01/2021.

ZOETIS, 2020. Tackzuron pour-on - Informação técnica - Ficha técnica. Disponível em <<https://www.zoetis.com.br/pesquisa-de-produtos/produtos/tackzuron-pour-on.aspx>>, acesso em 17 abri. 2021.

5. ARTIGO

FLUAZURON INFLUENCIA A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE VACAS WAGYU

(Fluazuron influences the *in vitro* embryo production of Wagyu cows)

RESUMO

O Brasil se destaca no cenário mundial de produção de carne bovina e, para isso, depende do emprego de um manejo sanitário e reprodutivo de qualidade. Contudo, em algumas situações, as drogas veterinárias empregadas no manejo sanitário podem influenciar a resposta das biotécnicas da reprodução empregadas no rebanho. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de resíduos químicos de carrapaticida a base de fluazuron, no sangue e no líquido folicular e verificar a qualidade da produção *in vitro* de embriões (PIVE) de vacas da raça Wagyu submetidas a tratamento com o carrapaticida. Foram utilizadas 20 fêmeas bovinas adultas de raça Wagyu, doadoras de oócitos, distribuídas em 2 grupos: G1 – animais que não foram submetidos ao controle de carrapatos e G2, animais que foram submetidos ao controle de carrapatos com produto à base de fluazuron. Após a aplicação (D0), todas as vacas foram submetidas à sincronização estral, em quatro momentos durante o experimento, assim, nos dias D12, D33, D54 e D75 foram realizadas as aspirações do líquido folicular dos folículos dominantes e foram colhidas amostras de sangue para extração, pelo método QuEChERS, e análise da presença de resíduos químicos, empregando CG-EM. No mesmo momento foram colhidos os ovócitos para a PIVE. Foram detectados resíduos de fluazuron no plasma dos animais até 54 dias após a aplicação do carrapaticida, porém, não foram detectados resíduos no líquido folicular. Os animais tratados com carrapaticida apresentaram um maior número de oócitos totais e viáveis ($p < 0,0001$), contudo, a taxa de viabilidade e a taxa de blastocisto foi menor ($p < 0,0001$). O uso do carrapaticida comprometeu a PIVE, por isso, sugere-se mais pesquisas sobre o assunto a fim de propor um protocolo mais seguro e apropriado de sincronização e coleta de oócitos para animais tratados com carrapaticidas, e assim, contribuir com o desenvolvimento da cadeia produtiva de bovinos de corte.

Palavras-chave: biotécnicas da reprodução; carrapaticida; líquido folicular; resíduos químicos.

ABSTRACT

Brazil stands out in the world beef production scenario and, for that, it depends on the use of quality sanitary and reproductive management. However, in some situations, the veterinary drugs used in health management can influence the response of the reproductive biotechniques used in the herd. Thus, the aim of this study was to assess the presence of chemical residues of fluazuron based ticks in blood and follicular fluid and to verify the quality of *in vitro* embryo production

(IVPE) of Wagyu cows submitted to treatment with ticks. Twenty adult Wagyu bovine females were used, donors of oocytes, distributed in 2 groups: G1 - animals that were not submitted to tick control and G2, animals that were subjected to tick control with fluazuron based product. After application (D0), all cows were subjected to estrous synchronization, in four moments during the experiment, thus, on days D12, D33, D54 and D75, aspirations of the follicular fluid from the dominant follicles were performed and blood samples were collected for extraction, by the QuEChERS method, and analysis of the presence of chemical residues, using GC-MS. At the same time, the oocytes were collected for IVPE. Fluazuron residues were detected in the animals' plasma up to 54 days after the application of the tick, but no residues were detected in the follicular fluid. The animals treated with ticks presented a higher number of total and viable oocytes ($p < 0.0001$), however, the viability rate and the blastocyst rate were lower ($p < 0.0001$). The use of ticks has compromised IVPE, therefore, further research on the subject is suggested in order to propose a safer and more appropriate protocol for synchronizing and collecting oocytes for animals treated with ticks, and thus contributing to the development of the production chain. beef cattle.

Keywords: biotechniques of reproduction; cattle tick pesticide; follicular fluid; chemical waste.

INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca no cenário mundial de produção de carne bovina, sendo o detentor do maior rebanho comercial e o maior exportador da carne, posicionando o país como protagonista no cenário mundial da produção de gado de corte (ABIEC, 2020). Por isso, o emprego de boas práticas de manejo deve ser constantemente considerado, sobretudo o manejo sanitário, pois doenças infectocontagiosas, endoparasitoses e ectoparasitoses podem reduzir os índices de desenvolvimento do plantel (BERGE; VERTENTEN, 2017).

Por ser um país tropical, um ectoparasita de importância econômica no país é o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CHEFER; SOUZA, 2016), sendo que a principal forma de controle é o químico, baseado no uso de produtos denominados carrapaticidas. Esse controle se acentua, principalmente, com a introdução de raças importadas, as quais são mais suscetíveis aos carrapatos e, por isso, dependem de um controle mais intensivo (MAPHOLI et al., 2014).

A raça bovina Wagyu, de origem japonesa, foi introduzida no Brasil a fim de ampliar o rol de raças criadas e oferecer um produto com qualidade diferenciada, visto que sua carne é reconhecida mundialmente pela maciez, suculência e sabor, características resultantes da carcaça com elevados níveis de

marmoreio e da alta quantidade de gordura insaturada (TANINAKA et al., 2015). Sendo assim, fomentar essa criação traz vantagens econômicas para o Brasil. Entretanto, conforme apontado, raças importadas como a Wagyu, são mais suscetíveis aos carrapatos, fato que demanda um controle ectoparasitário mais intenso.

Somado a este fato, aponta-se que para a manutenção ou aumento nos índices produtivos da cadeia produtiva bovina, é necessário o emprego das biotécnicas da reprodução (COLOMBO et al., 2017), como a produção *in vitro* de embriões (PIVE), que permite a disseminação de embriões de alta qualidade e desempenha um papel importante no melhoramento genético dos rebanhos (GUSMÃO; SILVA; MEDEIROS, 2017).

Contudo, verifica-se uma escassez de pesquisas que relacionem o emprego de carrapaticidas com o desempenho da PIVE em vacas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de resíduos químicos de carrapaticida a base de fluazuron, no sangue e no líquido folicular e verificar a qualidade da PIVE de vacas da raça Wagyu submetidas a tratamento com o carrapaticida.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Fazenda Escola, da Universidade Cesumar/ UNICESUMAR, Maringá, estado do Paraná (23°25'S, 51°57'W e altitude de 550 metros), Brasil, em 2020.

Foram utilizadas 20 fêmeas bovinas adultas de raça Wagyu, doadoras de oócitos, com idade entre 12 a 24 meses e peso médio de 510,25 Kg. Os animais estavam em perfeitas condições corporais, com escore corporal entre 3 e 3,5 e com ótimas condições sanitárias e reprodutivas. Os animais foram mantidos em piquetes de braquiária (*Brachiaria brizantha* cv MG-5), com suplementação mineral e água *ad libitum*, sendo submetidas ao manejo higiênico adotado na propriedade.

Os animais foram distribuídos em 2 grupos experimentais: Grupo 1 (G1) – animais que não foram submetidas ao controle de ectoparasitas e Grupo 2 (G2), animais que foram submetidos ao controle. Assim, no dia zero do experimento (D0), as vacas do G2 foram submetidas ao controle de carrapatos com produto à base de fluazuron (Tackzuron Pour On® - Zoetis), com uma dosagem de 2,5 mg kg⁻¹ de peso corporal, obtida com a aplicação de 5,0 mL/50 kg de peso corporal,

conforme estabelecido na bula do produto. A dose total foi administrada em duas faixas, em ambos os lados da linha dorsal, da nuca até a garupa, com o aplicador do produto. O período de carência informado pelo fabricante, para bovinos para o abate é de 45 dias após a última aplicação (ZOETIS, 2021).

Após, todas as vacas foram submetidas à sincronização estral, em quatro momentos durante o experimento, com intervalos de 21 dias. Para a sincronização, foi usado implante auricular contendo 5,0mg de Norgestomet (progestágeno) (Crestar® - Lab. Intervet Ltda) e 2,0mg de benzoato de estradiol (BE) (Estrogin® - Lab. Farmavet Ltda) via intramuscular. Nos dias D7, D28, D59 e D71, o implante auricular foi retirado e foi aplicado 2,0mL Prostaglandina F₂α (PGF₂α) (Ciosin® - Lab. Coopers Ltda), via intramuscular.

Nos dias D12, D33, D54 e D75 foram realizadas as aspirações do líquido folicular dos folículos dominantes para análise da presença de resíduos químicos. O líquido folicular foi acondicionado em microtubos e armazenado a -20°C para as análises posteriores. No mesmo momento, foram aspirados os demais folículos para obtenção dos oócitos (Figura 2).

A aspiração do líquido folicular do folículo dominante foi realizada por meio de aparelho de ultrassom marca ALOKA tipo SSD500 com sonda setorial convexa de 5 MHz adaptada a um sistema de agulha (18 G) e acoplada ao sistema de vácuo (bomba) com a aspiração folicular correspondendo a, aproximadamente, 13 a 15 mL de água por minuto. O líquido folicular aspirado foi coletado e transferido para microtubos e encaminhado para análise em laboratório.

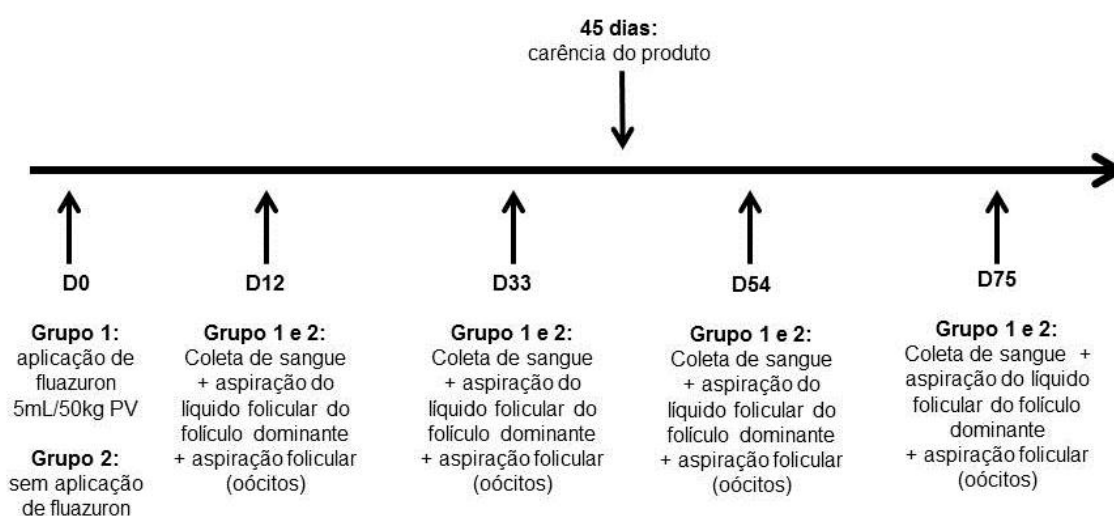


Figura 2. Protocolo experimental.

A aspiração dos demais folículos para obtenção dos oócitos também foi realizada por meio de aparelho de ultrassom marca ALOKA tipo SSD500 com sonda setorial convexa de 5 MHz adaptada a um sistema de agulha (18 G) e acoplada ao sistema de vácuo (bomba). A pressão de vácuo foi obtida por intermédio de uma bomba (Cook V-MAR 5000®), ajustada entre 38 e 45mmHg, permitindo um fluxo de 12mL de meio/minuto. Os oócitos foram aspirados com uma solução contendo 2,0% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Nutricell®, Campinas, SP, Brasil), 25UI/mL de heparina sódica e 98,0% de Tampão Fosfato Salino (PBS) (Nutricell®, Campinas, SP, Brasil).

No momento da aspiração folicular foi realizada uma anestesia epidural baixa com 5mL de lidocaína a 2% (Pearson®, São Paulo/ SP, Brasil) para diminuir os movimentos peristálticos e o desconforto no animal. Após a administração da lidocaína, o animal teve a vulva lavada e limpa com papel toalha. Na sequência, foi inserido o transdutor até o fundo de saco vaginal, com a manipulação dos ovários através do reto, buscando a melhor visualização dos mesmos na tela do ultrassom. Os folículos foram posicionados na linha de punção indicada na tela do ultrassom e aspirados, de acordo com o objetivo do estudo. Após o término da aspiração, o sistema de vácuo foi limpo com o meio de recebimento dos oócitos e as agulhas utilizadas foram descartadas.

Para a lavagem e seleção dos oócitos, o material aspirado foi transferido para o filtro de colheita de embriões e lavado com o mesmo meio utilizado para aspiração. Sendo separado o líquido folicular em frascos de 50 mL e logo após, transferido para microtubos.

Os sedimentos restantes no filtro foram transferidos para placa de Petri e foi realizada a busca, contagem e a classificação dos oócitos como viáveis e inviáveis. Foram considerados viáveis (grau I, II e III) os oócitos que apresentarem a presença de *cumulus* e ooplasma homogêneos, e inviáveis (grau IV) aqueles desnudos ou picnóticos, heterogêneos e com vesículas apoptóticas (DE LOOS et al., 1989).

A maturação *in vitro* (MIV) foi realizada em TCM199 com sais de Earles (Gibco®), glutamina (Sigma® cod.: G8540) e NaHCO₃ (Mallinckrodt®), suplementado com 10% de SFB (Cultilab®), 22µg/mL piruvato (Biochemical® cod.: 44094), 50µg de gentamicina (Sigma® cod.: G1272), 0,5µg de FSH/mL

(Bioniche®), 50µg de LH/mL (Bioniche®) e 1µg de estradiol/mL (Sigma® cod.: E2758), mantidos em estufa, a 39°C, 5% de CO₂ em ar com máxima umidade, durante 22 a 24 horas. Os oócitos foram colocados em microgotas de 90µL de meio de maturação cobertas por óleo mineral.

A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada em 100µL de meio TALP suplementado com 10µg/mL de heparina (Sigma cod.: H3149), 22µL/mL de piruvato (Biochemical® cod.: 44094), 50 µg/mL de gentamicina (Sigma® cod.: G1272), albumina sérica bovina-BSA (sem ácidos graxos) (Sigma® cod.: A3311), solução de PHE 2µM de penicilina (Sigma® cod.: P4875), 1µM de hipotaurina (Sigma® cod.: H1384) e 0,25µM de epinefrina (Sigma® cod.: E4250). O sêmen sexado de touro Wagyu foi descongelado em banho-maria a 36°C. Para seleção dos espermatozoides móveis e remoção de diluidores e de plasma seminal, foi realizada centrifugação em gradiente Percoll (90 e 45%), durante 4 min à 4 rpm. Foram utilizados 1×10^{-6} espermatozoides/mL, e os oócitos foram transferidos para as microgotas (20 oócitos/gota), onde permaneceram por 18 horas, a 39°C, em atmosfera com 5% de CO₂ em ar.

Após a fertilização, os zigotos foram cultivados *in vitro* (CIV), no meio SOF (*Synthetic Oviduct Fluid*) suplementado com SFB (Nutricell®, Campinas, SP, Brasil), com monocamada de células da granulosa. O cultivo foi realizado por 18 horas pós-inseminação, em incubadora, com atmosfera gasosa contendo 20% CO₂ em ar, com máxima umidade.

Sete dias após a fecundação, os embriões foram avaliados e envazados em palhetas de 0,25 mL para posteriormente serem inovulados nas receptoras.

Para a análise da presença de resíduos químicos do carrapaticida no sangue foram colhidas amostras de sangue nos mesmos dias das coletas de líquido folicular e de oócitos, ou seja, dias D12, D33, D54 e D75 após a aplicação do carrapaticida, para elaboração da curva de decaimento do princípio ativo do produto e de seus metabólitos. Foram coletadas amostras de 10 mL de sangue, por punção da veia jugular, em tubos heparinizados, sendo logo em seguida submetidas à centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos. O plasma foi separado, acondicionado em microtubos, em duplicata de 1 mL cada, e armazenado a -20°C para as análises posteriores.

Para a extração e análise em cromatografia gasosa, às amostras de plasma foram preparadas adicionando-se 10g de amostra de sangue em um tubo

falcon, contendo 250mg sulfato de magnésio, 250g de sódio cloreto e 5mL de acetonitrila. As amostras foram agitadas vigorosamente por 1 minuto, seguidas de decantação por centrifugação (5.000 rpm) durante 2 min. Após a separação de fases, a camada superior obtida da mistura foi transferida para cartucho QuEChERS, contendo 50mg de MgSO_4 , 15mg de PSA e 30mg de C18, para separar os analitos desejados da matriz, agitando-se, vigorosamente, por 1 minuto e decantando por centrifugação a 5000 rpm por 2 min. Para a análise do líquido folicular, as quantidades foram reduzidas, sendo que as amostras foram preparadas adicionando-se 1g de amostra de líquido folicular em um tubo falcon, contendo 125mg sulfato de magnésio, 125mg de sódio cloreto e 3mL de acetonitrila, seguidas de agitação e decantação por centrifugação da mesma maneira que o plasma e, após a separação de fases, a camada superior obtida foi transferida para cartucho QuEChERS, contendo 1g de MgSO_4 , 15mg de PSA e 7,5mg de C18, seguindo-se a agitação e a decantação. A camada superior separada, tanto das amostras de plasma quanto das amostras de líquido folicular, foi filtrada e injetada diretamente no CG-EM. Todas as extrações foram realizadas duplicata.

Após o preparo das amostras, elas foram inseridas em um cromatógrafo a gás (modelo Agilent 7890B) com injetor automático (CTC PAL Control), acoplado a um espectrômetro de massa (Modelo Agilent 5977A MSD), equipado com coluna HP-5MS UI Agilent com fase de 5% de fenil metil siloxano (30,0m x 250 μm d.i. x 0,25 μm de espessura do filme). Para a separação adequada dos analitos no sistema CG-EM, 2 μL de cada amostra extraída foi injetada na coluna usando o modo de injeção Split na razão 1:50, nas seguintes condições do forno: temperatura inicial de 70°C mantida por 2,5 min, em seguida rampa de 15°C min^{-1} até 175°C mantida por 13 min, e rampa de 20°C min^{-1} até 290 °C e mantida por 15 min.

As demais condições do método de análise foram: volume de injeção de 1,0 μL , fluxo do gás de arraste (He, pureza 99,99999%) igual a 1,2 mL min^{-1} , ionização por impacto eletrônico de 70 eV, temperatura da fonte de ionização de 230°C, do quadrupolo de 150°C, da linha de transferência de 280°C e do injetor de 250°C. A aquisição dos dados foi feita pelo software MassHunter e análise qualitativa dos espectros de massas pela biblioteca NIST 11. A quantificação da droga veterinária foi realizada através de curva de calibração pré-estabelecida

com nível mínimo de 0,5 e máximo de 8,0 µg/mL e também pela presença do padrão interno de octadecano.

Os dados foram tabulados e as análises estatísticas das variáveis foram feitas empregando o procedimento PROC NPAR1WAY do programa estatístico SAS (2000), versão 8.01 sendo as médias da concentração plasmática e do líquido folicular analisadas pelo teste de *Kruskal-Wallis*; para a análise da eficiência do OPU, taxa de viabilidade (porcentagem de oócitos viáveis em relação ao total de oócitos) e da taxa de blastocisto (porcentagem de embriões em relação ao total de oócitos viáveis) seguiu-se a distribuição de Poisson e função de ligação identidade.

Os protocolos das técnicas empregadas para coleta dos dados desta pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Cesumar / UNICESUMAR, parecer N° 07/2020.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da análise de fluazuron no sangue, conforme esperado, diferiu entre os grupos ($p < 0,0001$) aos 12, 33 e 54 dias após a aplicação do produto, contudo, a droga não foi detectada no dia 75 (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração plasmática de fluazuron em vacas doadoras da raça Wagyu submetidas a uma dose de 2,5 mg kg⁻¹ de peso corporal de formulação comercial *pour on* de fluazuron em função dos dias após a aplicação (µg/mL).

Dias após a aplicação de fluazuron	G1 - controle (µg/mL)	G2 - fluazuron (µg/mL)	P valor
D12	0,0	3,80	<0,0001
D33	0,0	2,19	<0,0001
D54	0,0	0,85	<0,0001
D75	0,0	ND	

G1: grupo de animais que não foram submetidos ao tratamento com carrapaticida; G2: grupo de animais que foram submetidos ao tratamento com carrapaticida.

Estes dados são interessantes, visto que, conforme apontado na bula do produto, o período de carência informado pelo fabricante, para bovinos para o abate é de 45 dias após a aplicação (ZOETIS, 2021), sendo assim, esperava-se que o mesmo não fosse detectado nas amostras da coleta do D54. O decaimento nos níveis séricos foi de 42,37%, 77,63% e 100% em relação aos níveis de fluazuron em D12.

Com o objetivo de estudar a característica farmacocinética do fluazuron em bovinos, Ferreira et al. (2019) avaliaram e validaram um método de cromatografia líquida-detecção ultravioleta (CL-UV). Os autores afirmaram que o fluazuron, administrado por via tópica nos animais, com uma dosagem de 2,5 mg kg⁻¹, atingiu a circulação sistêmica e foi absorvido (T_{máx} = 48 Hs), se mantendo quantificável em níveis plasmáticos por até 14 dias após o tratamento. Esta informação difere dos achados deste estudo, visto que, a droga foi detectada em até 54 dias após sua aplicação. Talvez, esta diferença possa ser atribuída à sensibilidade da técnica usada, já que, neste estudo foi empregada CG-EM, a qual é mais sensível do que a CL-UV.

O Comitê de Medicamentos para Uso Veterinário, da *European Medicines Agency* (EMA), publicou em 2017, um regulamento que estabelece Limites Máximos de Resíduos (LMR) para fluazuron em peixes de barbatana, válido em toda a União Europeia (EMA, 2017). Neste documento, os pesquisadores afirmaram que um método altamente específico para análises de fluazuron é o método de Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (CL-EM), o qual de fato, é mais sensível do que o empregado em nosso estudo, contudo, de modo geral, observa-se o emprego de muitas técnicas diferentes nas publicações sobre dosagem de fluazuron.

Alguns trabalhos, conduzidos com bovinos de diferentes raças, e que aplicaram doses de fluazuron, administrada via tópica (“*pour-on*”), que variaram entre 1,25 a 2,5 mg kg⁻¹ de peso corporal, relataram valores de resíduos da droga no plasma de 0,002 a 0,001 µg/mL, após 42 e 84 dias, respectivamente (THOMAS; SWINDALE; HESS, 1992; SWINDALE et al., 1993), revelando valores muito abaixo dos encontrados nesta pesquisa.

O Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de agroquímicos (HERMIDA, PELAEZ; SILVA, 2015). Por isso, várias agências estão envolvidas na determinação dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) nos produtos agropecuários, como o Codex *Alimentarius* (CODEX), a Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos (EMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Apesar do elevado grau de assimetria e subjetividade presente nos critérios de decisão adotados pelos países e pelos comitês de especialistas, observa-se que, os LMR de fluazuron em bovinos apresentados pelas agências são semelhantes, sendo 7.000 µg/kg na gordura, 200 µg/kg no músculo, 500

µg/kg no fígado e rim e 200 µg/kg no leite, contudo, os documentos não fazem menção aos níveis plasmáticos.

Baseado na técnica e na curva de calibração empregados neste estudo, não foi possível detectar resíduos químicos de fluazuron no líquido folicular. Aponta-se que, talvez, empregando-se uma curva de calibração ainda mais sensível ou se fosse possível obter um volume maior de líquido folicular ou empregar uma etapa de pré-concentração de líquido folicular mais efetiva, ou usar métodos analíticos mais sensíveis como a CL-EM talvez o mesmo pudesse ter sido detectado, apesar da boa sensibilidade da curva empregada neste estudo.

O líquido folicular (LF) bovino é um exsudato do plasma sanguíneo com diferentes fatores proteicos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, esteróides e muitos outros metabólitos sintetizados pelas células da parede folicular (GORDON, 2003). A composição do líquido folicular é similar à do soro com relação aos componentes de baixo peso molecular e a maioria dos eletrólitos (SHALGI et al., 1972). Entretanto, alguns componentes podem variar, pois a lâmina basal do folículo pode funcionar como uma barreira para a difusão de substâncias, como as proteínas maiores que 100 KDa (CLARKE et al., 2006; SIU, CHENG, 2013), assim, outra hipótese é de que a lâmina basal tenha barrado a transferência do resíduo de fluazuron para o líquido folicular.

Já foi relatada a importância de alguns constituintes do LF na aquisição da competência de desenvolvimento do oócito. Os esteróides, como o estradiol e progesterona, estão relacionados com o crescimento e atresia dos folículos, produzindo efeito também nos oócitos. De fato, o LF possui uma variedade de funções relacionadas ao oócito incluindo a manutenção da parada meiótica, proteção contra proteólise, extrusão durante a ovulação e proteção contra influências hemáticas adversas (SOHEL; CINAR, 2014) e, por isso, baseados em sua importância fisiológica e no fato de que resíduos de medicamentos veterinários podem ser encontrados em vários tecidos (XIN-LUN et al., 2013; ZHANG et al., 2013), esta pesquisa foi conduzida, contudo, sem êxito na detecção.

Com relação à eficiência da *Ovum pick-up* (OPU), foram observadas diferenças entre os grupos em todas as variáveis estudadas ($p < 0,0001$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Eficiência média de quatro sessões de *ovum pick-up* (OPU) e da produção *in vitro* de embriões em vacas doadoras da raça Wagyu submetidas a uma dose de 2,5 mg kg⁻¹ de peso corporal de formulação comercial *pour on* de fluazuron.

Variáveis	G1(n=10)	G2 (n=10)	Valor de p
Oócitos totais (M±EP)	11,8 ± 0,54	15,1 ± 0,61	<0,0001
Número de oócitos viáveis (M±EP)	8,77 ± 0,47	10,47 ± 0,51	<0,0001
Taxa de viabilidade (%)	74,59 ± 1,36	68,68 ± 1,31	<0,0001
Número de oócitos inviáveis (M±EP)	3,27 ± 0,28	4,6 ± 0,34	<0,0001
Número de embriões (M±EP)	3,05 ± 0,7	2,65 ± 0,6	<0,0001
Taxa de blastocisto (%)	34,73 ± 0,93	24,54 ± 0,78	<0,0001

G1: grupo de animais que não foram submetidos ao tratamento com carrapaticida; G2: grupo de animais que foram submetidos ao tratamento com carrapaticida. Taxa de viabilidade: porcentagem de oócitos viáveis em relação ao total de oócitos; Taxa de blastocisto: porcentagem de embriões em relação ao total de oócitos viáveis; M±EP: média e mais ou menos erro padrão da média.

Foi possível observar que, apesar do maior número de oócitos totais e viáveis, a taxa de viabilidade, o número de embriões e a taxa de blastocisto no grupo das doadoras que foram tratadas com carrapaticida foram menores ($p<0,0001$). Com base nestes resultados, infere-se que, de fato, como o número de folículos é determinado, principalmente, por fatores genéticos (BLONDIN et al., 2012), não houve efeito do tratamento nesta variável, contudo, quando as estruturas foram submetidas em sistema de cultura *in vitro*, o efeito apareceu. Então, mesmo que não tenha sido detectado resíduo de fluazuron no líquido folicular, mas considerando os níveis circulantes no sangue e os efeitos negativos obtidos na produção *in vitro* de embriões (PIVE), acredita-se que se empregando uma curva de calibração ainda mais sensível seja possível detectá-lo e elucidar melhor estes resultados.

Entretanto, reporta-se que apesar dos efeitos significativos encontrados, os valores obtidos neste estudo são semelhantes aos reportados em outros estudos realizados com vacas doadoras da raça Wagyu. Em uma pesquisa cujo objetivo foi investigar a eficiência da superestimulação ovariana com FSH em fêmeas bovinas doadoras de oócitos da raça Wagyu sobre a dinâmica folicular e sobre a produção *in vitro* de embriões, Queiróz (2019), reportou números médios de oócitos totais entre 12,2 e 17,4, de oócitos viáveis entre 10,2 e 13,0, uma taxa de viabilidade entre 74,5 a 83,6%, um número de embriões que variou de 2,4 a 3,0 e uma taxa de blastocisto em torno de 23%. Com o objetivo avaliar a sincronização folicular utilizando benzoato de estradiol, com a presença do corpo

lúteo, em fêmeas bovinas doadoras de oócitos da raça Wagyu, na produção *in vitro* de embriões, Zamaí (2020) observou valores de oócitos totais entre 10,50 e 12,83, taxa de viabilidade em torno de 74%, total de embriões produzidos entre 2,40 a 2,85 e taxa de blastocisto entre 19,16 a 26,44%.

Porém, pondera-se que o número de oócitos totais e viáveis obtidos nesta pesquisa e nos estudos de Queiróz (2019) e Zamaí (2020), independente do tratamento, foi menor do que os reportados pela literatura para outras raças (SARTORI et al., 2016), evidenciando uma inferioridade neste quesito para doadoras da raça Wagyu. Contudo, apesar deste achado, ressaltam-se as outras vantagens reprodutivas das fêmeas da raça Wagyu, como precocidade sexual, facilidade de parto, habilidade materna e longevidade (ZANELLA, 2018).

Estudos na literatura científica que avaliem o líquido folicular, a OPU e a PIVE em animais submetidos a tratamento com carrapaticida são escassos. Mas, uma pesquisa conduzida pelo *The International Programme On Chemical Safety* (1997), com ratos, avaliou a toxicidade reprodutiva do fluazuron em concentrações dietéticas de 0, 100, 1.500 ou 20.000 mg/kg e apontou que o fluazuron não provocou efeitos adversos na função reprodutiva dos animais (IPCS, 1997).

Apesar desses resultados, Cabry et al. (2020) afirmaram que a exposição a pesticidas pode causar estresse oxidativo generalizado, com produção elevada de radicais livres e impactos na atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, redutase e transferase. Assim, presume-se que esses impactos possam explicar, em parte, os resultados obtidos em nosso estudo. Talvez, a avaliação dos oócitos por meio de análises mais aprofundadas, como exemplo, metabolômica, possa comprovar os efeitos destes compostos sobre os aspectos reprodutivos de vacas doadoras de oócitos, já que, a avaliação dos oócitos recuperados, a fertilização e a clivagem do embrião refletem, diretamente, na porcentagem de perdas embrionárias (AL-HUSSAINI et al., 2018), impactando a cadeia produtiva.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que foi possível detectar resíduos de fluazuron no plasma de vacas doadoras da raça Wagyu em até 54

dias após a aplicação de carrapaticida comercial *pour on* de fluazuron, contudo, não foram detectados resíduos de fluazuron no líquido folicular.

Com relação à eficiência da *ovum pick-up*, apesar dos animais tratados com carrapaticida apresentarem um maior número de oócitos totais e viáveis, a taxa de viabilidade e a taxa de blastocisto foi menor.

Por essa razão, a fim de elucidar melhor esses efeitos, sugere-se que mais pesquisas sejam conduzidas nesta área, buscando elucidar, com mais precisão e segurança, os efeitos desta droga sobre os aspectos reprodutivos de vacas.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES ABIEC – Perfil da Pecuária no Brasil. Relatório Anual, 2018, São Paulo: **ABIEC**, 2018.

AL-HUSSAINI, T.K.; ABDELALEEM, A.A.; ELNASHAR I. et al. The effect of follicular fluid pesticides and polychlorinated biphenyls concentrations on intracytoplasmic sperm injection (ICSI) embryological and clinical outcome. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 220, p.39-43, 2018.

BERGE, A. C; VERTENTEN, G. Whitepaper: The importance of preventive health and vaccination programmes in ruminant production. 2017. Disponível em: <<https://www.timetovaccinate.com/>>. Acesso em 18 de jan. de 2020.

BLONDIN, P.; VIGNEAULT, C.; NIVET, A. L.; SIRARD, M. A. Improving oocyte quality in cows and heifers - What have we learned so far? *Animal Reproduction*, v.9, n. 3, p. 281-289, 2012.

CABRY, R.; MERVIEL, P.; MADKOUR, A. et al. The impact of endocrine disruptor chemicals on oocyte/embryo and clinical outcomes in IVF. **Endocrine connections**, v. 9, n. 6, p.134-142, 2020.

CHEFER, D. M; SOUZA, D. M. Bovinocultura de corte: principais manejos durante a fase de cria. **Revista Iniciare**, v. 1, n. 1, 2016.

COLOMBO, A. H. B.; CAVALIERI, F. L. B.; ANDREAZZI, M. A. et al. Avaliação de biotécnicas da reprodução sob o foco ambiental. **Archives of Veterinary Science**, v. 22, n. 1, 2017.

CLARKE, H.G.; HOPE, S.A.; BYERS, S.; RODGERS, R.J. Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. **Reproduction**, v.132, p.119-131, 2006.

DE LOOS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, A.M. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v.24, p.197-204, 1989.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY – EMA. Guideline for Good Clinical Practice Londres, 2017.

FERREIRA, T. P.; LIMA, I. P.; AVELAR, B. R. et al. Bioanalytical Method to Measure Fluazuron in Bovine Plasma and its Application in Pharmacokinetic Studies. **Revista Virtual de Química**, v.11, p. 1067-1079, 2019.

GORDON, I.R. 2003. Laboratory Production of Cattle Embryos (Biotechnology in Agriculture). 2nd rev ed. Wallingford, UK: CABI Publishing.

GUSMÃO, A. O. M.; SILVA, A. R.; MEDEIROS, M. O. A biotecnologia e os avanços da sociedade. **Biodiversidade**. v. 16, n. 1, p. 1-20, 2017.

HERMIDA, C.; PELAEZ, V.; SILVA, L. R. Limites de Resíduos de plaguicidas y barreras técnicas de comércio. **Agroalimentaria**, v. 21, p. 151-170, 2015.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - IPCS. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Fluazuron: WHO Food Additives series 39. Geneva:WHO (World Health Organization), 1997. Disponível em:< <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v39je09.htm>>. Acesso em: 21 jan 2021.

MAPHOLI, N. O.; MARUFU, M. C., MAIWASHE, A. et al. Towards a genomics approach to tick (Acari: Ixodidae) control in cattle: a review. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 5, p. 475-483, 2014.

QUEIRÓZ, F.M. **Protocolo de superovulação associado ao coasting de FSH em doadoras de oócitos da raça Wagyu para produção *in vitro* de embriões**. 2019. Maringá, 59f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Limpas) – Curso de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, Universidade Cesumar.

SARTORI, R.; GIMENES, L.U.; MONTEIRO, P.L.J. et al. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenology**, v.86, n.1, p.32-40, 2016.

SAS - STATISTICAL ANALYSES SYSTEM. Versão 8.01. Cary, NC: 2000. (Manual On-line).

SHALGI, R.; KRAICER, P.; RIMON, A.; PINTO, M.; SOFERMAN, N. Proteins of human follicular fluid: the blood-follicle barrier. **Fertility and Sterility**, v.24, p.429–434, 1973.

SIU, M. K.Y.; CHENG, C. Y. The blood-follicle barrier (BFB) in disease and in ovarian function. In: **Biology and Regulation of Blood-Tissue Barriers**. Springer, New York, NY, 2013. p. 186-192.

SOHEL, M. M. H.; CINAR, M. U. Advancement in Molecular Genetics to understand the molecular reproduction of Livestock follicular development. **Research in Agriculture Livestock and Fisheries**, v.1, n.1, p.47-60, 2014.

SWINDALE, M.S.; SIBSON, G.; BULL, M.S. et al. Controle de carrapatos bovinos em Queensland tropical úmido com ACATAK Pour-on. Ciba-Geigy Limited, Kemps Creek, Austrália. 1993.

TANINAKA, T.; BERNARDINO, T.; MENEHINI, R. et al. Análise da viabilidade econômica de um rebanho de gado de corte da raça Wagyu em ciclo completo. **Revista iPecege**, v. 1, n. 2, p. 44-58, 2015.

THOMAS, P.L.; SWINDALE, M.S.; HESS, E.A. Persistência do efeito acaricida do fluazuron, aplicado em formulação pour-on a 1,5 e 2,5 mg / kg, contra *Boophilus microplus*. Ciba-Geigy Limited, Kemps Creek, Austrália. 1992.

XIN-LUN, L.; YU-MEI, Z.; CHENG-YUN, H. et al. Pharmacokinetics of fluazuron in cattle. **Chinese Journal of Veterinary Science**. v.10, p.1595, 2013

ZAMAI, M.F. **Produção *in vitro* de embriões de fêmeas bovinas da raça wagyu empregando biotecnologias modificadas**. 2020. Maringá, 55f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Limpas) – Curso de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, Universidade Cesumar.

ZANELLA, R. Raça Wagyu. Portal do Agronegócio. Disponível em <<http://ruralpecuaria.com.br/tecnologia-e-manejo/racas-gado-de-corte/raca-wagyu.html>> acessado em 20/01/2021.

ZHANG, Y.; LU, X.; HU, C. et al. Development of a high-performance liquid chromatography method for quantification of fluazuron in cattle tissues. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologie**, v.36, p.2559, 2013.

ZOETIS, 2020. Tackzuron pour-on - Informação técnica - Ficha técnica. Disponível em < <https://www.zoetis.com.br/pesquisa-de-produtos/produtos/tackzuron-pour-on.aspx>>, acesso em 03 de maio 2020.

6. NORMAS DO ARTIGO

DIRETRIZES PARA AUTORES

INSTRUÇÃO AOS AUTORES

O periódico **ARCHIVES OF VETERINARY SCIENCE (AVS)** é publicado trimestralmente, sob orientação do seu Corpo Editorial, com a finalidade de divulgar artigos completos e de revisão relacionados à ciência animal sobre os temas: clínica, cirurgia e patologia veterinária; sanidade animal e medicina veterinária preventiva; nutrição e alimentação animal; sistemas de produção animal e meio ambiente; reprodução e melhoramento genético animal; tecnologia de alimentos; economia e sociologia rural e métodos de investigação científica. A publicação dos artigos científicos dependerá da observância das normas editoriais e dos pareceres dos consultores "ad hoc". Todos os pareceres têm caráter sigiloso e imparcial, e os conceitos e/ou patentes emitidos nos artigos, são de inteira responsabilidade dos autores, eximindo-se o periódico de quaisquer danos autorais. A submissão de artigos deve ser feita diretamente na página da revista (www.ser.ufpr.br/veterinary). Mais informações são fornecidas na seção "Informações sobre a revista".

APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS

Para agilizar a tramitação e publicação de seu artigo, recomendamos fortemente que as normas sejam obedecidas, inclusive para as referências

1. Digitação: O artigo com no máximo vinte e cinco páginas deverá ser digitado em folha com tamanho A4 210 x 297 mm, com margens laterais direita, esquerda, superior e inferior de 2,5 cm. As páginas deverão ser numeradas de forma progressiva no canto superior direito. Deverá ser utilizado fonte arial 12 em espaço duplo; em uma coluna. Tabelas e Figuras com legendas serão inseridas diretamente no texto e não em folhas separadas.

2. Identificação dos autores e instituições (máximo 6 autores por artigo): Todos os dados referentes a autores devem ser inseridos exclusivamente nos metadados no momento da submissão online. Não deve haver nenhuma identificação dos autores no corpo do artigo enviado para a revista. Os autores devem inclusive remover a identificação de autoria do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista.

3. Tabelas: Devem ser numeradas em algarismo arábico seguido de hífen. O título será inserido na parte superior da tabela em caixa baixa (espaço simples) com ponto final. O recuo da segunda linha deverá ocorrer sob a primeira letra do título. (Ex.: Tabela 1 – Título.). As abreviações devem ser descritas em notas no rodapé da tabela. Estas serão referenciadas por números sobrescritos (1,2,3). Quando couber, os cabeçalhos das colunas deverão possuir as unidades de medida. Tanto o título quanto as notas de rodapé devem fazer parte da tabela, inseridos em "linhas de tabela".

4. Figuras: Devem ser numeradas em algarismo arábico seguido de hífen. O título será inserido na parte inferior da figura em caixa baixa (espaço simples) com ponto final. O recuo da segunda linha deverá ocorrer sob a primeira letra do título (Ex.: Figura 1 – Título). As designações das variáveis X e Y devem ter iniciais maiúsculas e unidades entre parênteses. São admitidas apenas figuras em preto-e-branco. **Figuras coloridas terão as despesas de clichê e impressão a cores pagas pelo autor.** Nesse caso deverá ser solicitada ao Editor (via ofício) a impressão a cores.

NORMAS EDITORIAIS

Artigo completo - Deverá ser inédito, escrito em idioma português (nomenclatura oficial) ou em inglês. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimento(s) (quando houver); Nota informando aprovação por Comitê de Ética (quando houver); Referências.

Artigo de Revisão - Os artigos de revisão deverão ser digitados seguindo a mesma norma do artigo científico e conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Agradecimento(s) (quando

houver); Referencias. **A publicação de artigos de revisão fica condicionada à relevância do tema, mérito científico dos autores e disponibilidade da Revista para publicação de artigos de Revisão.**

ESTRUTURA DO ARTIGO

TÍTULO - em português, centralizado na página, e com letras maiúsculas. Logo abaixo, título em inglês, entre parêntesis e centralizado na página, com letras minúsculas e itálicas. Não deve ser precedido do termo título.

RESUMO - no máximo 1800 caracteres incluindo os espaços, em língua portuguesa. As informações devem ser precisas e sumarizar objetivos, material e métodos, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço duplo. Deve ser precedido do termo “Resumo” em caixa alta e negrito.

PALAVRAS-CHAVE – inseridas abaixo do resumo. Máximo de cinco palavras em letras minúsculas, separadas por ponto-e-vírgula, em ordem alfabética, retiradas exclusivamente do artigo, não devem fazer parte do título, e alinhado a esquerda. Não deve conter ponto final. Deve ser precedido do termo “Palavras-chave” em caixa baixa e negrito.

ABSTRACT -deve ser redigido em inglês, refletindo fielmente o resumo e com no máximo 1800 caracteres. O texto deve ser justificado e digitado em espaçoduplo, em parágrafo único. Deve ser precedido do termo “Abstract” em caixa alta e negrito.

KEY WORDS - inseridas abaixo do abstract. Máximo de cinco palavras em letras minúsculas, separadas por ponto-e-vírgula, em ordem alfabética, retiradas exclusivamente do artigo, não devem fazer parte do título em inglês, e alinhado a esquerda. Não precisam ser traduções exatas das palavras-chave e não deve conter ponto final. Deve ser precedido do termo “Key words” em caixa baixa e negrito.

INTRODUÇÃO – abrange também uma breve revisão de literatura e, ao final, os objetivos. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Introdução” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

MATERIAL E MÉTODOS - o autor deverá ser preciso na descrição de novas metodologias e adaptações realizadas nas metodologias já consagradas na experimentação animal. Fornecer referência específica original para todos os procedimentos utilizados. Não usar nomes comerciais de produtos. O texto deverá iniciar sob a primeira letra do termo “Material e Métodos” (escrito em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

RESULTADOS (O item Resultados e o item Discussão podem ser apresentados juntos, na forma RESULTADOS e DISCUSSÃO, ou em itens separados)

o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Resultados” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda. Símbolos e unidades devem ser listados conforme os exemplos: Usar **36%**, e não 36 % (não usar espaço entre o **no** e %); Usar **88 kg**, e não 88Kg (com espaço entre o **no** e kg, que deve vir em minúsculo); Usar **42 mL**, e não 42 ml (litro deve vir em **L maiúsculo**, conforme padronização internacional); Usar **25oC**, e não 25 oC (sem espaço entre o **no** e oC); Usar (**P<0,05**) e não (p < 0,05); Usar **r² = 0,89** e não r²=0,89; Nas tabelas inserir o valor da probabilidade como “valor de P”; Nas tabelas e texto utilizar média ± desvio padrão (15,0 ± 0,5). Devem ser evitadas abreviações não-consagradas, como por exemplo: “o T3 foi maior que o T4, que não diferiu do T5 e do T6”. Este tipo de redação é muito cômodo para o autor, mas é de difícil compreensão para o leitor. Escreva os resultados e apresente suporte com dados. Não seja redundante incluindo os mesmos dados ou resultados em tabelas ou figuras.

DISCUSSÃO - o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Discussão” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda. Apresente a sua interpretação dos seus dados. Mostre a relação entre fatos ou generalizações reveladas pelos seus resultados. Aponte exceções ou aspectos ainda não resolvidos. Mostre como os seus resultados ou interpretações concordam com trabalhos previamente publicados ou discordam deles, mas apresente apenas trabalhos originais, evitando citações de terceiros. Discuta os aspectos teóricos e/ou práticos do seu trabalho. Pequenas especulações podem ser interessantes, porém devem manter relação factual com os seus resultados. Afirmações tais

como: "Atualmente nós estamos tentando resolver este problema..." não são aceitas. Referências a "dados não publicados" não são aceitas. Conclua sua discussão com uma curta afirmação sobre a significância dos seus resultados.

CONCLUSÕES - preferencialmente redigir a conclusão em parágrafo único, baseada nos objetivos. Devem se apresentar de forma clara e sem abreviações. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra "Conclusão" (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

AGRADECIMENTOS - os agradecimentos pelo apoio à pesquisa serão incluídos nesta seção. Seja breve nos seus agradecimentos. Não deve haver agradecimento a autores do trabalho. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra "Agradecimento" (escrita em caixa baixa).

NOTAS INFORMATIVAS - quando for o caso, antes das referências, deverá ser incluído parágrafo com informações e número de protocolo de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética e ou Biossegurança. (quando a Comissão de Ética pertencer à própria instituição onde a pesquisa foi realizada, deverá constar apenas o número do protocolo).

REFERÊNCIAS - o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra "Referências" (escrita em caixa alta e negrito). Omitir a palavra bibliográficas. Alinhada somente à esquerda. Usar como base as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (NBR 10520 (NB 896) - 08/2002). Devem ser redigidas em página separada e ordenadas alfabeticamente pelo(s) sobrenome(s) do(s) autor(es). Os destaques deverão ser em NEGRITO e os nomes científicos, em ITÁLICO. NÃO ABREVIAR O TÍTULO DOS PERIÓDICOS. Indica-se o(s) autor(es) com entrada pelo último sobrenome seguido do(s) prenome(s) abreviado (s), exceto para nomes de origem espanhola, em que entram os dois últimos sobrenomes. Mencionam-se os autores separados por ponto e vírgula. Digitá-las em espaço simples e formatá-las segundo as seguintes instruções: no menu FORMATAR, escolha a opção PARÁGRAFO... ESPAÇAMENTO...ANTES...6 pts.**Exemplo de como referenciar:**

ARTIGOS DE PERIÓDICOS:

(citar os 3 primeiros autores seguido de "et al.")

JOCHLE, W.; LAMOND, D.R.; ANDERSEN, A.C. et al. Mestranol as an abortifacient in the bitch. **Theriogenology**, v.4, n.1, p.1-9, 1975.

Livros e capítulos de livro. Os elementos essenciais são: autor(es), título e subtítulo (se houver), seguidos da expressão "In:", e da referência completa como um todo. No final da referência, deve-se informar a paginação. Quando a editora não é identificada, deve-se indicar a expressão *sine nomine*, abreviada, entre colchetes [s.n.]. Quando o editor e local não puderem ser indicados na publicação, utilizam-se ambas as expressões, abreviadas, e entre colchetes [S.l.: s.n.].

REFERÊNCIA DE LIVROS (*in totum*):

BICHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Small animal practice**. Philadelphia : W.B. Saunders, 1997. 1467 p.

REFERÊNCIA DE PARTES DE LIVROS: (Capítulo com autoria)

SMITH, M. Anestrus, pseudopregnancy and cystic follicles. In: MORROW, D.A. **Current Therapy in Theriogenology**. 2.ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1986, Cap.x, p.585-586.

REFERÊNCIA DE PARTES DE LIVROS: (Capítulo sem autoria)

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4., p.72-90.

OBRAS DE RESPONSABILIDADE DE UMA ENTIDADE COLETIVA: A entidade é tida como autora e deve ser escrita por extenso, acompanhada por sua respectiva abreviatura. No texto, é citada somente a abreviatura correspondente. Quando a editora é a mesma instituição responsável pela autoria e já tiver sido mencionada, não é indicada.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. **Official methods of analysis**. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025p.

REFERÊNCIA DE TESE/DISSERTAÇÃO/MONOGRAFIA:

BACILA, M. **Contribuição ao estudo do metabolismo glicídico em eritrócitos de animais domésticos.** 1989. Curitiba, 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

REFERÊNCIA DE PUBLICAÇÕES EM CONGRESSOS:

KOZICKI, L.E.; SHIBATA, F.K. Perfil de progesterona em vacas leiteiras no período do puerpério, determinado pelo radioimunoensaio (RIA). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXIV., 1996, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Goiana de Veterinária, 1996, p. 106-107.

RESTLE, J.; SOUZA, E.V.T.; NUCCI, E.P.D. et al. Performance of cattle and buffalo fed with different sources of roughage. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, 1994. p.301-303.

REFERÊNCIA DE ARTIGOS DE PERIÓDICOS ELETRÔNICOS: Quando se tratar de obras consultadas *on-line*, são essenciais as informações sobre o endereço eletrônico, apresentado entre os sinais < >, precedido da expressão "Disponível em: xx/xx/xxxx" e a data de acesso do documento, precedida da expressão "Acesso em: xx/xx/xxxx."

PRADA, F.; MENDONÇA Jr., C. X.; CARCIOFI, A. C. [1998]. Concentração de cobre e molibdênio em algumas plantas forrageiras do Estado do Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.35, n.6, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/> Acesso em: 05/09/2000.

MÜELLER, Suzana Pinheiro Machado. A comunicação científica e o movimento de acesso livre ao conhecimento. *Ciência da Informação*, Brasília, v. 35, n. 2, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-19652006000200004&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 13/05/2007.

REBOLLAR, P.G.; BLAS, C. [2002]. **Digestión de la soja integral em ruminantes.** Disponível em: http://www.ussoymeal.org/ruminant_s.pdf. Acesso em: 12/10/2002.

SILVA, R.N.; OLIVEIRA, R. [1996]. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URPe, 4., 1996, Recife. **Anais eletrônico...** Recife: Universidade Federal do Pernambuco, 1996. Disponível em: <http://www.propesq.ufpe.br/anais/anais.htm> Acesso em: 21/01/1997.

CITAÇÃO DE TRABALHOS PUBLICADOS EM CD ROM: Na citação de material bibliográfico publicado em CD ROM, o autor deve proceder como o exemplo abaixo:

EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; OLIVEIRA, M.P. Avaliação de cultivares de *Panicum maximum* em pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais...** São Paulo: Gmosis, 1999, 17par. CD-ROM. Forragicultura. Avaliação com animais. FOR-020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE INFORMAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Bases de dados em Ciência e Tecnologia.** Brasília, n. 1, 1996. CD-ROM.

E.mail Autor, < e-mail do autor. "Assunto", Data de postagem, e-mail pessoal, (data da leitura)

Web Site Autor [se conhecido], "Título"(título principal, se aplicável), última data da revisão [se conhecida], < URL (data que foi acessado)

FTP Autor [se conhecido] "Título do documento"(Data da publicação) [se disponível], Endereço FTP (data que foi acessado)

CITAÇÕES NO TEXTO: As citações no texto deverão ser feitas em caixa baixa. Quando se tratar de dois autores, ambos devem ser citados, seguido apenas do ano da publicação; três ou mais autores, citar o sobrenome do primeiro autor seguido de et al. obedecendo aos exemplos abaixo:

Silva e Oliveira (1999)

Schmidt et al. (1999)

(Silva et al., 2000)

Archives of Veterinary Science

Setor de Ciências Agrárias

Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Rua dos Funcionários, 1540 80035-050 - Curitiba - Paraná - Brasil

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que foi possível detectar resíduos de fluazuron no plasma de vacas doadoras da raça Wagyu até 54 dias após a aplicação de carrapaticida comercial *pour on* de fluazuron, contudo, não foram detectados resíduos de fluazuron no líquido folicular.

Com relação à eficiência da *ovum pick-up*, os animais tratados com carrapaticida apresentaram um maior número de oócitos totais e viáveis, contudo a taxa de viabilidade e a taxa de blastocisto foram menores.

Sugere-se que mais pesquisas sejam conduzidas, a fim de comprovar os efeitos desta droga sobre os aspectos reprodutivos de vacas doadoras de oócitos, visto que, o mesmo permanece circulante no sangue por muito tempo. Com mais estudos, será possível propor um protocolo mais apropriado de sincronização e coleta de oócitos para animais tratados com carrapaticidas, e assim, contribuir com o desenvolvimento sustentável da cadeia pecuária.

ANEXO 1

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA




UNICESUMAR – Centro Universitário de Maringá
Diretoria de Pesquisa



PARECER

USO EXCLUSIVO CEUA			
PROTÓCOLO Nº	002/2021	PARECER	002/2021
PROTOCOLADO EM:	22/03/2021	ESPÉCIE ANIMAL:	Bovina
SEXO:	F	IDADE APROXIMADA:	1 a 2 anos
QUANTIDADE:	20	PESO APROXIMADO:	510 Kg

I – IDENTIFICAÇÃO				
<input type="checkbox"/> PROJETO DE ENSINO	<input checked="" type="checkbox"/> PROJETO DE PESQUISA	<input type="checkbox"/> PROJETO DE EXTENSÃO	<input type="checkbox"/> PLANO DE AULA	
<input type="checkbox"/> PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA	<input type="checkbox"/> PROJETO DE PESQUISA DOCE	<input type="checkbox"/> PROJETO DE PÓS GRADUAÇÃO		
II – PESQUISADOR RESPONSÁVEL				
Fábio Luiz Sim Cavallari				
III – INSTITUIÇÃO/DEPARTAMENTO				
Unicesumar/Medicina Veterinária				
IV – TÍTULO DO PROJETO				
ESTUDO SOBRE RESÍDUOS QUÍMICOS DE ECTOPARASITÁRIOS EM BOVINOS.				
V – CONSIDERAÇÕES DO PARECERISTA				
• Realizou todas as modificações sugeridas.				
VI – SITUAÇÃO				
<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO				
<input type="checkbox"/> PENDENTE				
<input type="checkbox"/> REPROVADO				
De acordo,				
				
Prof. Dr. Marcelo Picinin Bemuci				
Coordenador da CEUA				
Data Reunião: 23/03/2021				