UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo de depleção residual de benzoato de emamectina em
filés de peixe e estimativa de período de carência**

Pedro Fraccarolli Neto

Ribeirão Preto

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo de depleção residual de benzoato de emamectina em filés de
peixe e estimativa de período de carência**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de concentração: Toxicologia

Orientado: Pedro Fraccarolli Neto

Orientador: Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato
Paschoal

Versão corrigida da dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 11/06/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2018

FRACCAROLLI NETO, P.	Estudo de depleção residual de benzoato de emamectina em filés de peixe e estimativa de período de carência		MESTRADO FCFRP USP 2018
----------------------------	--	--	-------------------------------

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Fraccarolli Neto, Pedro

Estudo de depleção residual de benzoato de emamectina em filés de peixe e estimativa de período de carência. Ribeirão Preto, 2018.
54p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Paschoal, Jonas Augusto Rizzato.

1. Benzoato de emamectina, 2. Antiparasitário, 3. Aquicultura, 4. Estudo de depleção, 5. Período de carência, LC-MS/MS, QuEChERS.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Pedro Fraccarolli Neto

Título do trabalho: Estudo de depleção residual de benzoato de emamectina em filés de peixe e estimativa de período de carência.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato
Paschoal

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Fernando e Vera, por sempre apoiarem minhas ideias e investirem na minha educação.

Aos meus avós Pedro e Iolanda por todo incentivo, conselhos e orações.

Ao meu amor, Fabiana, pelo apoio incondicional e por sempre estar ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Ao Professor Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal pela orientação, paciência, conselhos e por todo o conhecimento transmitido.

Ao Professor Dr. Oswaldo de Freitas, Máira e José Maria, pelo auxílio durante o processo de revestimento da ração.

Aos amigos de laboratório, Ana Paula, Zenais, Marina, Juliana, Carol, Carlos, João, Jonas e Sarah, pela ajuda diária, amizade e ensinamentos.

Ao Agnaldo por não medir esforços em me ajudar e me ensinar durante a rotina de trabalho.

Ao Centro de Aquicultura da Unesp Jaboticabal pela disponibilidade do local para o experimento com os peixes.

Ao Evandro por me ajudar muito com o experimento com os peixes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e bolsa concedida durante a realização do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro através do projeto 2012/18334-0.

RESUMO

FRACCAROLLI NETO, P. **Estudo de depleção residual de benzoato de emamectina em filés de peixe e estimativa de período de carência.** 2018. 64f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O benzoato de emamectina, um antiparasitário da classe das avermectinas, é amplamente utilizado em diversos países para o tratamento de infecções causadas por helmintos intestinais e ectoparasitas, os quais estão relacionados a grandes prejuízos na produção aquícola. Apesar de sua eficácia ser conhecida na aquicultura, seu uso não está regulamentado no Brasil. Diante da demanda nacional por uma maior variedade de medicamentos veterinários regulamentados para uso em espécies aquícolas, o presente projeto visou estimar um período de carência para o antiparasitário benzoato de emamectina, a partir de um estudo experimental de depleção residual desse fármaco em tilápia (filé com pele em proporção natural), a espécie de maior importância comercial para a produção aquícola no Brasil. Para tanto, fez-se necessárias as seguintes etapas: (i) incorporar o benzoato de emamectina na ração através da técnica de revestimento polimérico em equipamento de leito fluidizado; (ii) desenvolver e validar métodos analíticos para a determinação do benzoato de emamectina na ração e em filé de tilápia empregando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC- MS/MS); e (iii) realizar um ensaio com tilápias para avaliar a depleção residual de emamectina B1a no filé. O revestimento da ração com 1,5% de etilcelulose permitiu incorporar o benzoato de emamectina na ração sem alterar a estrutura física da mesma, o que torna o processo vantajoso, visto que a ração mantém suas características nutricionais e de fluabilidade. Além disso, o processo foi homogêneo (CV de 2,1%) e não apresentou taxa de lixiviação quantificável do fármaco para a água, contribuindo para uma maior segurança em relação à dose de tratamento a ser administrada e em relação ao risco potencial ao meio ambiente. A emamectina B1a foi extraída da ração por processo sólido-líquido e do filé de tilápia pelo método QuEChERS modificado. Os métodos foram avaliados mediante os seguintes parâmetros: seletividade, curva analítica, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Todos os parâmetros avaliados se encontraram conformes às recomendações dos guias de validação tomados como referências, qualificando os métodos como adequados para os objetivos propostos no presente trabalho. Para avaliar a depleção de emamectina B1a no filé de tilápia, os peixes receberam o fármaco via ração em dose de 50 µg/kgPV/dia durante sete dias consecutivos. As curvas de depleção residual de emamectina B1a se ajustaram ao modelo exponencial de primeira ordem. Tomando como referência o limite máximo de resíduo de 100 µg/kg recomendado pelo *Codex Alimentarius*, não houve a necessidade de se propor um período de carência mínimo para o abate dos peixes, considerando as condições experimentais empregadas.

Palavras-chave: benzoato de emamectina, antiparasitário, aquicultura, estudo de depleção, período de carência, LC-MS/MS, QuEChERS.

ABSTRACT

FRACCAROLLI, P. **Depletion study of emamectin benzoate in fish fillet and determination of withdrawal period**. 2018. 64f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Emamectin benzoate, an antiparasitic of the class of avermectins, it is widely used in several countries for the treatment of infections caused by intestinal helminths and ectoparasites, which are related to great losses in aquaculture production. Although its known effectiveness for aquaculture, its use is not regulated in Brazil. The national demand for a greater variety of regulated veterinary drugs for use in aquaculture species, the current project that aimed to evaluate a withdrawal period for the antiparasitic emamectin benzoate, based on an experimental study of residual depletion of this drug in tilapia (fillet with skin in natural proportion) the species of major commercial importance for aquaculture production in Brazil. To do so, it was necessary to: (i) incorporate emamectin benzoate into the feed through the polymer coating technique in fluidized bed equipment; (ii) to develop and validate the analytical methods for the determination of emamectin benzoate in the feed and in tilapia fillet using high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS / MS) and (iii) perform a tilapia test to evaluate the depletion of emamectin B1a in fillet. The feed coating with 1.5% ethylcellulose allowed to incorporate the emamectin benzoate into the feed without altering the physical structure, which makes the process advantageous, since the feed retains its nutritional and buoyancy characteristics. In addition, the process was homogeneous (CV 2,1%) and did not present quantifiable leaching rate of the drug into the water, contributing to a greater safety in relation to the dose of treatment to be administered and in relation to potential risk to the environment. Emamectin B1a was extracted from the feed by solid-liquid process and from tilapia fillet by the modified QuEChERS method. The methods were evaluated using the following parameters: selectivity, analytical curve, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LD) and quantification (LQ). All the evaluated parameters were in accordance with the recommendations of the validation guides taken as references, qualifying the methods as adequate for the objectives proposed in the present work. To evaluate the depletion of emamectin B1a tilapia fillet, the fish received the drug via feed at a dose of 50 µg / kgPV / day for seven consecutive days. The residual depletion curves of emamectin B1a were fitted to the first order exponential model. Taking into account the maximum residue limit of 100 µg / kg recommended by the *Codex Alimentarius*, there was no need to propose a minimum withdrawal period for the slaughtering of fish, considering the experimental conditions used.

Key words: emamectin benzoate, antiparasitic drug, aquaculture, depletion study, withdrawal period, LC-MS/MS, QuEChERS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Benzoato de Enamectina : Homólogos B1a e B1b.	5
Figura 2 - Caixas de 310 litros utilizadas no experimento	20
Figura 3 - Fotografias em sequência dos procedimentos para retirada dos filés	21
Figura 4 - Curva analítica para a determinação da EMA-B1a na ração e seu respectivo gráfico	22
Figura 5 - Comparação entre os cromatogramas da amostra branco de ração fortificada (A) com benzoato de emamectina à concentração de 10 ng/g e (b) da amostra branco.	23
Figura 6 - Curva analítica para a determinação da EMA-B1a em filé de tilápia e seu respectivo gráfico de resíduos.....	28
Figura 7 - Comparação entre o cromatograma da amostra branco de carne fortificada (A) com benzoato de emamectina e o cromatograma da amostra branco (B).	29
Figura 8 - Gráfico da curva de depleção residual da EMA-B1a a partir do modelo matemático de ajustes não lineares adotado.	32
Figura 9 – Gráfico da curva de depleção residual da EMA-B1a a partir da regressão linear. LMR: Limite Máximo de Resíduo; (a): reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%.	33
Figura 10 – Gráfico de distribuição normal dos erros do ajuste da regressão linear.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da ração comercial utilizada no estudo, segundo fabricante.	10
Tabela 2 - Composição da fase móvel em eluição por gradiente.	13
Tabela 3 - Critérios para aprovação dos parâmetros de precisão e exatidão conforme o guia do MAPA (2011).	15
Tabela 4 - Critérios para aprovação dos parâmetros de precisão e exatidão conforme o guia VICH-FDA (2015).	19
Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos da água20	20
Tabela 6 - Resultados de precisão e exatidão do método para a determinação de EMA-B1a na ração.	24
Tabela 7 - Análise da ração preparada com benzoato de emamectina.	26
Tabela 8 - Resultados de precisão e exatidão do método para a determinação de EMA-B1a em filé de tilápia.	30
Tabela 9 - Concentrações médias de EMA-B1a na carne de tilápia nos diferentes períodos de abate após a medicação dos peixes.	31
Tabela 10 - Parâmetros do ajuste do modelo matemático não linear para a curva de depleção residual da EMA-B1a32	32
Tabela 11 - Parâmetros do ajuste da regressão linear da curva de depleção residual da EMA-B1a.	34
Tabela 12 - Análise da variância para avaliação da homogeneidade das variâncias.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
EMA-B1a	Emamectina B1a
ESI	Ionização por Eletronebulização
FAO Alimentação	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação
FDA	Agência Americana de Drogas e Alimentos
FNC	Fenacetina
JECFA	JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES
LC–MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
LMR	Limite Máximo de Resíduos
MAPA	Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento
PI	Padrão Interno
PSA	Amina Primária e Secundária
QuEChERS	Rápido, Fácil, Efetivo, Robusto, Seguro
SRM	Monitoramento das Reações Seleccionadas
WHO	Organização Mundial da Saúde

Sumário

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1 Materiais	8
3.1.1 Equipamentos	8
3.1.2 Reagentes e soluções.....	9
3.2 Métodos	9
3.2.1 Incorporação do benzoato de emamectina na ração	9
3.2.2 Estudo de lixiviação do fármaco da ração para a água.....	11
3.2.3 Método analítico para determinação do fármaco na ração	11
3.2.3.1 Extração de EMA-B1a da ração.....	12
3.2.3.2 Condições do sistema LC-MS/MS para análise da ração	12
3.2.3.3 Avaliação de desempenho analítico do método desenvolvido para ração	13
3.2.4 Método analítico para determinação do fármaco em filé de tilápia	15
3.2.4.1 Extração de EMA-B1a do filé de tilápia	15
3.2.4.2 Condições do sistema LC-MS/MS para análise do filé de tilápia	16
3.2.4.3 Avaliação de desempenho analítico do método desenvolvido para filé	16
3.2.5 Estudo de depleção residual e estimativa de período de carência	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Método analítico para a ração.....	22
4.1.1 Avaliação de desempenho analítico do método desenvolvido para ração	22
4.1.1.1 Linearidade	22
4.1.1.2 Seletividade.....	22
4.1.1.3 Precisão e Exatidão	24
4.1.1.4 Efeito residual (carry over)	25
4.1.2 Eficiência de extração da EMA-B1a da ração	25
4.2 Avaliação do processo de incorporação do benzoato de emamectina na ração	25

4.3 Ensaio de lixiviação do fármaco da ração.....	26
4.4 Método analítico para o filé de tilápia.....	26
4.4.1 Método de extração da EMA-B1a do filé de tilápia	27
4.4.2 Avaliação de desempenho analítico do método desenvolvido para filé de tilápia.....	28
4.4.2.1 Linearidade	28
4.4.2.2. Seletividade.....	29
4.4.2.3 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)	30
4.4.2.4 Precisão e Exatidão	30
4.4.2.5 Efeito residual (<i>carry over</i>)	31
4.5 Estudo de depleção residual	31
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
7. ANEXO.....	44
7.1 Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	44

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é o cultivo de organismos que apresentam, em condições naturais, o seu ciclo de vida total ou parcialmente no meio aquático (VICENTE e FONSECA-ALVES, 2013). Essa atividade é praticada pelo homem há milhares de anos, sendo que há evidências de que seja praticada na China há muitos séculos e que os egípcios cultivavam tilápias para a alimentação há quatro mil anos (MPA, 2014).

A aquicultura abrange a criação de peixes em água doce ou marinha (piscicultura), a produção de moluscos (malacocultura), a criação de camarão ou caranguejo (carcinicultura) e a cultura de algas (algicultura) (SIDONIO *et al.*, 2012). Segundo dados do MPA (2014) o Brasil apresenta 12% da água doce disponível no planeta, com um litoral de aproximadamente oito mil quilômetros e uma extensa Zona Econômica Exclusiva.

O Brasil apresenta significativa disponibilidade de recursos hídricos e condições geográficas e climáticas favoráveis que permitem a produção tanto de espécies exóticas, como nativas. Verifica-se que o país detém um panorama com alto potencial para a exploração econômica através da aquicultura (CREPALDI *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2009; FONSECA & SILVA, 2004).

É crescente a demanda mundial por alimentos de origem aquática. Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO), nas últimas cinco décadas, o consumo de peixes no mundo superou o crescimento da população mundial. No presente momento, o consumo de peixe é visto como um hábito saudável e constitui uma importante fonte de proteína (FAO, 2016).

A aquicultura e a pesca, nos últimos anos, obtiveram os maiores índices de produtividade, abastecendo o mercado mundial com cerca de 167 milhões de toneladas de peixes, ou 19,7 kg/per capita/ano em 2013, com estimativas preliminares para 2014 e 2015 apontando para um crescimento superior a 20 kg/per capita/ano. Desse total, a aquicultura já é responsável por aproximadamente 44% (FAO, 2016). O Brasil é um dos poucos países que tem condições de atender à crescente demanda mundial por produtos de origem pesqueira, sobretudo por meio da aquicultura (MAP, 2014).

Destaca-se a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), espécie exótica, como sendo a espécie mais cultivada no mundo devido a sua ótima adaptação ao cativeiro (KUBITZA, 2000). Pertencente a Ordem Perciformes, Família Cichlidae, e podendo atingir até 60 cm de comprimento. É originária do continente africano, onde é encontrada nos rios litorâneos de Israel, rios Nilo e Jebel Marra e nas bacias dos rios Níger, Benue, Volta, Gâmbia, Senegal e Chade (FROESE & PAULY, 2011).

Destacam-se, dentre as suas principais características: curto ciclo de produção, rápido crescimento, tolerância a ambientes superpovoados, consumo de alimento natural, bem como de rações balanceadas e resíduos agropecuários de origem animal e vegetal, ótima qualidade de carne, ausência de mioespinhas, facilidade de filetagem e industrialização da carcaça, boa aceitação do filé no mercado consumidor e resistência ao manejo e às doenças (LEONHARDT, 1997).

Existem diferentes sistemas de cultivo de peixes, tais como: sistema extensivo, semi-intensivo, intensivo e superintensivo. Dentre os diferentes modelos de produção de pescado, destacam-se os cultivos em regime intensivo. Esse tipo de produção apresenta como principais vantagens o aproveitamento de ambientes aquáticos já existentes, como mar, rios, grandes reservatórios, açudes, canais de irrigação; além de apresentarem menor variação dos parâmetros físico-químicos da água durante a criação, maior facilidade de retirada dos peixes para venda, menor investimento inicial, facilidade de movimentação e relocação dos peixes, intensificação da produção, facilidade de observação dos peixes, redução do manuseio dos peixes (FURLANETO, et al., 2006).

Todo sistema intensivo de produção animal constitui-se em um ambiente favorável à disseminação de doenças devido à maior densidade populacional dos animais, com o agravante de que, na aquicultura, o ambiente aquático propicia a proliferação de doenças infecciosas. Eventuais alterações físico-químicas bruscas no ambiente aquático, como uma queda acentuada da temperatura, por exemplo, além de práticas de manejo inadequadas, afetam diretamente o estado de saúde dos peixes (PAVANELLI et al., 2002; ROTTA & QUEIROZ, 2003).

Como a aquicultura é diretamente dependente do ecossistema em que se insere o cultivo, para o seu sucesso é necessário manter-se uma boa qualidade ambiental, o que requer boas práticas de manejo, técnicas apropriadas de cultivo, um constante monitoramento do ambiente (DIAS, 2009) e a utilização de medicamentos

com fins terapêuticos e de profilaxia para assegurar uma boa produtividade (BORDON, 2014).

Produtos químicos, tanto de origem natural quanto sintética, como desinfetantes, parasiticidas, antibióticos, probióticos e outros aditivos alimentares, tornaram-se insumos indispensáveis para tratar e prevenir doenças bacterianas e/ ou parasitárias, para melhorar a qualidade da água, e/ou como promotores do crescimento. A utilização dessas substâncias tem contribuído para o aumento da produtividade e o crescimento do setor da aquicultura, mas também tem atraído críticas quanto à garantia de segurança toxicológica relacionadas ao consumo de alimento provenientes desses sistemas de produção (RICO et al., 2013; RICO et al., 2012).

Devido à pequena variedade de medicamentos veterinários prescritos para uso na aquicultura nacional e ao alto custo dos medicamentos disponíveis, há suspeita de que piscicultores estejam recorrendo ao uso irregular de medicamentos veterinários prescritos para outras espécies animais, e até mesmo ao uso de substâncias ilícitas, como o corante verde de malaquita (HASHIMOTO et al., 2011 e 2012; FAO, 2010).

Frente ao interesse brasileiro na expansão da aquicultura e a atual carência em medicamentos regulamentados para este fim, faz-se necessário estudos de novas classes de medicamentos veterinários destinados a atender essa demanda e que sejam efetivos contra as doenças que acometem as espécies de interesse.

Os peixes são passíveis de infecção por vírus, fungos, bactérias, protozoários, ecto e endohelmintos, que podem ser encontrados na superfície do corpo ou nos órgãos internos, geralmente, quando não lhes causam a morte, ocasionam lesões nos tecidos que comprometem a qualidade da carne para o consumo humano (PAVANELLI, 2002).

Ao entrar em contato com o peixe, os parasitas afetam o comportamento e a saúde do animal, causando perdas econômicas significativas. Tendo isso em vista, verifica-se a importância do tratamento quimioterápico para o desenvolvimento do setor (OLIVEIRA, 2014).

Os danos causados ao hospedeiro por doenças parasitárias dependem de vários fatores, como: o grupo do parasita em questão, a sua localização e o modo particular como atuam sobre o hospedeiro. Dentro deste contexto, as lesões branquiais são particularmente importantes, uma vez que esse órgão reage fortemente a presença de parasitas, provocando uma acentuada proliferação celular

e implicando na diminuição ou perda da respectiva atividade respiratória que, nos casos mais graves, pode provocar a morte do hospedeiro por asfixia (PAVANELLI et al., 2008).

Os crustáceos estão entre os mais importantes causadores de doenças aos peixes de água doce cultiváveis e também aos peixes selvagens. Além de possuírem um grande número de espécies de parasitas, chamam a atenção por serem visíveis de imediato e apresentam diversas formas e tamanho. (PAVANELLI et al, 1998).

Os crustáceos parasitas constituem um grupo de animais onde se verificam acentuadas variações morfofisiológicas que permitem dividir esses indivíduos em vários subgrupos, dos quais os principais são os copépodes, branquiúros e isópodes (THATCHER, 2006).

Os crustáceos copépodos são o terceiro maior grupo de parasitos de peixes dulcícolas, sendo responsável por perdas econômicas relevantes na aquicultura mundial (LUQUE e TAVARES, 2007). No Brasil, a infestação por copépodos tem sido frequente em tilápias (*Oreochromis niloticus*), com impacto sanitário resultante das lesões espoliativas no tegumento, narinas e brânquias do hospedeiro, predispondo estes animais a invasões secundárias de agentes infecciosos (TAVARES-DIAS et al., 2015)

Neste contexto, destacamos o benzoato de emamectina, um antiparasitário da classe das avermectinas, com reconhecida atividade sobre crustáceos, como um possível fármaco para uso na aquicultura brasileira, já que seu uso para este fim é regulamentado em outros países como Reino Unido, Irlanda, Finlândia, Espanha, Chile, Noruega, Islândia e Ilhas Faroé, por exemplo. (ROY et al., 2006)

As avermectinas, produzidas por cultura de *Streptomyces avermilitus*, são uma família de lactonas macrocíclicas, estritamente relacionadas, possuem propriedades anti-helmíntica e insecticidas, altamente potentes. Seu modo de ação é através da ligação aos canais de cloro-glutamato, onde aumenta a permeabilidade dos neurônios para íons cloreto, inibindo a sinapse em invertebrados, resultando em paralisia e morte. (ARENA, LIU, PARESS, FRAZIER, CULLY, MROZIK & SCHAEFFER 1995)

O benzoato de emamectina é um inseticida que atua no controle de larvas de lepidópteros (lagartas) que são pragas de espécies agrícolas de interesse econômico, tendo recebido seu primeiro registro no Japão em 1998 com o nome comercial de Affirm®, indicada para o controle de lepidópteros em vegetais folhosos (FAO, 2013).

O produto está regulamentado em 77 países para uso em mais de 90 cultivos agrícolas em todo o mundo. No Brasil, seu uso como inseticida na agricultura foi indeferido pela ANVISA em 2003, porém, devido a um surto da lagarta (*Helicoverpa armigera*) em plantações de algodão e soja, seu uso emergencial foi autorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) nas regiões onde foi decretado estado de emergência sanitária. Neste contexto, o monitoramento de seus resíduos se faz necessário para que não haja mau uso da substância.

A emamectina constitui-se em dois homólogos, 4"-deoxy-4"-epi-(methylamino) avermectina B1a e 4"-deoxy-4"-epi-(methylamino) avermectina B1b, em uma proporção de 9/1 (B1a/B1b), sendo que B1a é o homólogo marcador monitorado em análises de resíduos de benzoato de emamectina em produtos de origem animal. (Roberts et al.,1999).

Figura 1 - Benzoato de Emamectina : Homólogos B1a e B1b.

Seu uso na aquicultura, sob o nome comercial de Slice®, foi aprovado no Reino Unido em 2000 (RAE, 2000), administrado depois de incorporado à ração, na dose de 50 µg/kgPV/dia em sete dias consecutivos (MSD Animal Health), demonstrando excelentes resultados para o tratamento de salmões acometidos por copepodas.

Na octagésima primeira reunião do Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2015) foi discutida a necessidade de se realizar estudos de

depleção do benzoato de emamectina em espécies diferentes dos salmonídeos, sendo assim, mais um aspecto de relevância para o presente estudo.

A ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em produtos cárneos pode ser causada principalmente pela não obediência dos períodos de carência pré-abate, necessário para depuração do fármaco e seus metabólitos do organismo dos animais, ou mesmo com utilização acima das quantidades especificadas, que alteram esse tempo de carência. Outra possível fonte reside na contaminação ambiental, principalmente em sistema de criação em ambientes aquáticos onde a água de abastecimento pode receber resíduos e excrementos de outras criações de animais terrestres por lixiviação ou mesmo por adição direta para fins de alimentação (HIRSCH et al., 1999).

Alguns órgãos reguladores como o *Codex Alimentarius* têm estabelecido Limites Máximos de Resíduos (LMR) para uma grande variedade de fármacos veterinários em diversos tecidos animais. No que se refere à toxicologia alimentar e ambiental, é importante ressaltar que resíduos abaixo do valor do LMR são considerados como seguros. Além disso, preocupações relacionadas a perdas econômicas são constantes, pois barreiras alfandegárias podem inviabilizar a comercialização de alimentos entre países (MOREIRA, 2012).

Para o *Codex Alimentarius* o LMR de Emamectina B1a (EMA-B1a), que é o homólogo marcador, em salmonídeos é de 100 µg/kg e a ingestão diária aceitável (IDA) é de 0-0,5 µg/kg de peso corpóreo.

Os LMR devem ser levados em consideração no estabelecimento e validação do método, de modo a garantir que o método desenvolvido seja capaz de quantificar o resíduo destas substâncias com exatidão e precisão adequadas (PASCHOAL, 2007).

Até o momento, são raros os estudos voltados para a administração de benzoato de emamectina em peixes, principalmente em espécies cultivadas no Brasil. No entanto, por se tratar de um composto com potencial para emprego no setor aquícola, faz-se importante a disponibilidade de métodos de monitoramento de possível abuso de uso desses compostos em sistemas nacionais de criação, ou mesmo, em produtos alimentícios de origem aquícola importados.

Para se discutir a possibilidade de aprovação do uso de benzoato de emamectina nas espécies aquícolas, faz-se necessária a disponibilidade de dados científicos que demonstrem que o resíduo desse composto em produtos alimentícios

provenientes de animais tratados não ocorra em concentração acima daquela considerada toxicologicamente segura. Neste contexto, propôs-se o presente estudo que visa, em última estância, a realização de um estudo de depleção residual da emamectina em tilápias para a estimativa de um período de carência mínimo a ser recomendado, considerando os aspectos de segurança alimentar. Para tanto, inicialmente fez-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis que possibilitassem a determinação de EMA-B1a em ração e em filé de tilápia (músculo e pele em proporção natural) em níveis residuais de concentração (na ordem de $\mu\text{g}/\text{kg}$).

A determinação de resíduos de medicamentos veterinários em matrizes biológicas envolve uma etapa de extração dos compostos de interesse, seguida de limpeza do extrato, para posterior análise para a determinação (quali e/ou quantitativa) dos analitos. Considerando que matrizes biológicas são complexas por conterem inúmeras substâncias que influenciam o estabelecimento de um procedimento analítico seletivo, os alimentos são, de forma constante e incessante, alvos de trabalhos de pesquisa científica voltados ao desenvolvimento de métodos de análise confiáveis e eficientes, aplicados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários.

Com o argumento de prover resultados com alta confiabilidade, o emprego da cromatografia líquida associada à espectrometria de massas em métodos analíticos é indicado devido à alta seletividade e sensibilidade da técnica. Vários analisadores de massas, tais como o triplo-quadrupolo (QqQ) (BOGIALLI & DI CORCIA, 2009; ROBERT et al., 2013), tempo de voo (ToF) (PASCHOAL et al., 2009; ORTELLI et al., 2009), armadilha de íons (iontrap) (SMITH et al., 2009) e Orbitrap (VAN DER HEEFT et al., 2009), têm sido utilizados.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Estudo de incorporação do benzoato de emamectina na ração a ser administrada aos peixes;
- Desenvolvimento e validação do método analítico empregando LC-MS/MS para a determinação de EMA-B1a na ração;

- Realização de estudo de lixiviação de EMA-B1a da ração para a água.
- Estudo de preparo de amostra para o estabelecimento das condições de extração de EMA-B1a em filé de tilápia (músculo e pele em proporção natural);
- Desenvolvimento e validação do método analítico empregando LC-MS/MS para a determinação de EMA-B1a em filé de tilápia;
- Realização de um estudo experimental de depleção residual com tilápia a partir da medicação dos peixes com benzoato de emamectina via ração;
- Análise das amostras provenientes do experimento de depleção residual empregando o método analítico desenvolvido e validado;
- Análise estatística dos resultados obtidos com o propósito de se estimar um período de carência mínimo a ser recomendado para benzoato de emamectina em tilápias cultivadas sob condições típicas nacionais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos

A pesagem dos padrões dos fármacos utilizados na preparação da solução estoque foi realizada em balança Shimadzu AUW220D (SHIMADZU, Japão) devido a sua maior sensibilidade, enquanto que para a pesagem dos demais reagentes e da carne de peixe utilizou-se a balança analítica Marte AL 200C (MARTE BALANÇAS E APARELHOS DE PRECISÃO LTDA, Brasil).

Nas diferentes etapas que compõem o método de extração, estão sendo empregados os equipamentos: Mesa Agitadora PA 247 (Pachane, Brasil), agitador de soluções Vortex AP56 (Phoenix, Brasil), centrífuga Himac CF 5RX (Hitachi Koki Co. Ltd., Japão) e foram utilizados durante o procedimento analítico, no processo de extração da EMA-B1a das matrizes.

Foi utilizado sistema de filtração de água do tipo Milli-Q (Direct-Q 3, Merck Millipore, Alemanha) para a obtenção de água deionizada, a qual foi empregada no preparo de todas as soluções aquosas utilizadas no método analítico.

A fase móvel empregada no sistema LC-MS/MS foi diariamente sonicada em aparelho de ultra-som Maxi Clean 1450 (Unique, Brasil), antes do seu uso.

O sistema LC-MS/MS empregado é composto por um HPLC (Shimadzu, Japão) de sistema de bombeamento duplo, acoplado a um espectrômetro de massas (Quattro LC, Micromass, Manchester, UK) através de uma interface de eletronebulização (ESI), composto por analisadores de massas do tipo triplo-quadrupolo. A aquisição de dados foi realizada mediante o programa computacional MassLynx (Waters, EUA).

No procedimento de incorporação do fármaco à ração utilizou-se um agitador magnético com aquecimento modelo 752A (Fisatom, São Paulo, Brasil) e um equipamento de leito fluidizado modelo FBD 1.0 (Labmaq, São Paulo, Brasil). Para o ensaio de lixiviação do fármaco incorporado na ração para a água foi utilizado um banho metabólico com sistema de aquecimento e agitação, tipo dubnoff (Marconi, São Paulo, Brasil) e um pHmetro Orion modelo 420A+ (Thermo Electron Corporation, EUA).

3.1.2 Reagentes e soluções

Utilizou-se acetonitrila grau HPLC (JTBaker, Mexico), metanol grau HPLC (JTBaker, Mexico) e soluções de 0,01% e 1% de ácido fórmico grau HPLC (Merck, EUA). A solução estoque foi preparada a partir do padrão de benzoato de emamectina (99,3%, Sigma-Aldrich, EUA), por dissolução em metanol na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e estocada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Antes da injeção cromatográfica, filtraram-se os extratos das amostras com membrana regenerada de celulose (Sartorius stedim biotech, Alemanha) com 0,2 μm de tamanho de poro e com 25 mm de diâmetro.

3.2 Métodos

3.2.1 Incorporação do benzoato de emamectina na ração

Com o intuito de assegurar a qualidade nutritiva da ração a ser empregada nos estudos, fez-se uso da ração comercial da marca Guabi®, prescrita para peixes em fase de terminação (Pirá Acabamento contendo 28% de proteína), adquirida no comércio da cidade de Ribeirão Preto – SP, cuja composição nutricional pode ser verificada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição da ração comercial utilizada no estudo, segundo fabricante.

Ração Pirá (Guabi®)	
Umidade (máxima)	100 g/Kg
Proteína Bruta (mínima)	280 g/Kg
Extrato Étereo (máxima)	50 g/Kg
Matéria Mineral (máxima)	140 g/Kg
Fibra Bruta (máxima)	70 g/Kg
Cálcio (máxima)	35 g/Kg
Fósforo (mínimo)	6000 mg/Kg
Vitamina C (mínimo)	200 mg/Kg

O método desenvolvido para incorporar o benzoato de emamectina na ração visando o menor risco de perda do fármaco por lixiviação na água constituiu em revestir a ração com uma suspensão contendo um polímero e o fármaco, tomando-se como referência, estudos prévios realizados no grupo (Busatto et al., 2017).

Para tanto, uma suspensão do polímero com o fármaco, utilizada para promover o revestimento dos péletes de ração, foi preparada a partir da diluição de 15 g de etilcelulose em 1000 mL de álcool etílico 96 °GL e, em seguida, adicionados 5 mg de benzoato de emamectina por kg de ração. A suspensão empregada no revestimento da ração foi mantida sob agitação constante.

O processo de revestimento ocorreu em equipamento de leito fluidizado. A quantidade total de ração adicionada à câmara de revestimento foi de 500 g. A atomização da suspensão de revestimento sobre os péletes de ração foi realizada utilizando bico aspersor com diâmetro de 1,0 mm, posicionado na parte inferior do equipamento. Durante o revestimento, a temperatura do ar de entrada foi mantida em 50 °C e a vazão do soprador em 1,7 m³/min. A suspensão do polímero com o fármaco foi inserida na câmara de revestimento com vazão de 5 mL/min. O processo de incorporação levou em torno de 100 minutos.

3.2.2 Estudo de lixiviação do fármaco da ração para a água

Existem diferentes métodos de se administrar o medicamento ao peixe, dentre eles o banho de imersão, via injeção ou então através da incorporação do medicamento à ração. Dentre as vantagens de se administrar o medicamento via ração, estão, a facilidade e rapidez no manejo e o menor nível de stress causado aos peixes durante o procedimento. Entre as desvantagens, a principal delas é o risco de perda por lixiviação do fármaco para o ambiente aquático, podendo gerar riscos ao meio ambiente, além de perda na eficiência do tratamento dos peixes.

A eventual perda do fármaco incorporado à ração por lixiviação para a água foi avaliada com base no método descrito por (SOARES JÚNIOR, 2004). Para cada ensaio, pesou-se 1,0 g de ração (equivalente à quantidade de oito péletes de ração em média). Os péletes de ração foram colocados em béqueres contendo 900 mL de água. Em seguida, os béqueres foram submetidos à agitação branda. A temperatura foi monitorada e mantida em $25 \pm 1,5$ e o pH da água foi testado em 3 níveis diferentes: levemente ácido (pH 6); básico (pH 7); e ligeiramente básico (pH 8). Os testes foram realizados em triplicata (n=3).

Após o início dos ensaios nos diferentes pH avaliados, decorridos os tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos, foram coletadas alíquotas de 10 mL do meio aquoso, efetuando-se imediatamente após cada coleta, a reposição do mesmo volume de água (10 mL). Em seguida, as alíquotas foram filtradas com o auxílio de um filtro de membrana de celulose regenerada com porosidade de $0,20 \mu\text{m}$ de diâmetro. O filtrado foi transferido para um vial e 5,0 μL foram injetados no sistema LC-MS/MS.

É importante considerar que a solubilidade do benzoato de emamectina na água é $24 \mu\text{g/mL}$ (LEI FENG et al). Portanto, considerando que no ensaio, a maior concentração possível de EMA-B1a a ser lixiviada para a água seria de $10 \mu\text{g}$ em 900 mL, ou seja, $0,011 \mu\text{g/mL}$, temos que a solubilidade do analito em água não seria um fator que comprometeria a sua determinação.

Para a determinação da presença de EMA-B1a na água, utilizou-se para a quantificação, curva analítica do analito em água composta pelas concentrações 0,1, 1, 10, 25, 50, 100 ng/mL.

3.2.3 Método analítico para determinação do fármaco na ração

3.2.3.1 Extração de EMA-B1a da ração

À quantidade de 2,5 g de ração triturada foram adicionados 5 mL da solução extratora, composta por 75% de acetonitrila e 25% de metanol, sendo a mistura levada à agitação por vortex por 30 segundos e posteriormente a solução foi homogeneizada em mesa agitadora por 15 minutos. Em seguida, procedeu-se a centrifugação a 2900 g por 10 minutos. Uma alíquota de 200 µL foi coletada do sobrenadante e em seguida transferida para balão volumétrico de 10 mL. O volume do balão foi completado com metanol. O extrato obtido foi filtrado através de uma membrana com porosidade de 0,2 µm e posteriormente transferido para um vial. Um volume de 5 µL foi injetado no sistema LC-MS/MS.

Para a avaliação das condições estudadas no procedimento de extração da ração, foram analisadas as eficiências de extração obtidas para a EMA-B1a e a FNC (PI). Para tanto, fez-se a fortificação da matriz branco de ração com os analitos, em concentrações conhecidas. Com o intuito de assegurar a interação dos analitos com a matriz, a amostra foi deixada em repouso por 30 minutos antes de se iniciar o procedimento de extração. A quantificação da EMA-B1a foi realizada por uma curva de padronização externa, isto é, uma curva analítica obtida com a EMA-B1a em solução. Todos os testes foram realizados em triplicata, sendo os resultados expressos como porcentagem do valor esperado.

3.2.3.2 Condições do sistema LC-MS/MS para análise da ração

Para a separação cromatográfica, fazendo uso de Fenacetina como padrão interno, foi empregada fase móvel composta por solução aquosa 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e solução de ácido fórmico 0,1% em acetonitrila (solvente B), sob eluição em gradiente, vazão de 0,300 mL/min, temperatura mantida em 25 °C. O volume de injeção empregado será de 5 µL. Como fase estacionária, empregou-se a coluna X-Terra C₁₈ MS de dimensões 100 mm x 3,9 mm, i.d. 3,5 µm, precedida por coluna de guarda X-Terra MS C₁₈ 5 µm.

A interface entre o sistema cromatográfico e o de espectrometria de massas (MS) foi realizada pela fonte de ionização por eletronebulização, operando em modo positivo (ESI+). Os analisadores de massas do tipo triplo-quadrupolo foram programados para operar no modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM – *Multiple Reaction Monitoring*). As temperaturas da fonte de ionização e do gás de dessolvatação foram, respectivamente, de 100 °C e 450 °C. Nitrogênio foi empregado como gás de dessolvatação e de nebulização, operando sob vazões de aproximadamente 397 e 42 L/h, respectivamente, enquanto argônio foi empregado como gás de colisão. As voltagens empregadas na fonte ESI durante as análises foram de 40 V no cone, 3 kV no capilar e 3 V no extrator. Para o monitoramento por MRM, a energia de colisão empregada foi de 35 eV. As transições de quantificação monitoradas foram: m/z 887 > 158 para EMA-B1a e de 180 > 110 para FNC.

Foi selecionada a melhor proporção dos componentes da fase móvel, composta por solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (A) e solução de acetonitrila com ácido fórmico a 0,1% (B), objetivando a obtenção de uma corrida cromatográfica mais eficiente possível, com um perfil cromatográfico adequado para fins quantitativos. A partir dos testes realizados, selecionou-se a composição da fase móvel em eluição por gradiente com tempo de corrida de 13 minutos. O gradiente utilizado é mostrado na tabela 2.

Tabela 2 - Composição da fase móvel em eluição por gradiente.

Tempo (min)	Fase móvel aquosa A (%)	Fase móvel orgânica B (%)
0	50	50
3	5	95
6	5	95
7	50	50
13	50	50

3.2.3.3 Avaliação de desempenho analítico do método desenvolvido para ração

Depois de estabelecidas as condições do método analítico para quantificação da EMA-B1a na ração, procedeu-se a avaliação do desempenho analítico a partir dos parâmetros linearidade, seletividade (efeito matriz), precisão e a exatidão. Para tanto,

foi tomado como referência o Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica para Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários, elaborado pela Coordenação Geral de Apoio Laboratorial da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011). Considerando que a aplicação do método analítico desenvolvido se restringirá às análises das amostras provenientes nos estudos desta dissertação de mestrado, o número de replicatas empregado nas avaliações dos parâmetros foi reduzido em relação às recomendações do referido guia.

Para a avaliação da linearidade na ração, a curva analítica utilizada para a quantificação do EMA-B1a foi elaborada fortificando amostras branco de ração em cinco níveis de concentração: 10, 25, 50, 100, 150 ng/g. Para a fortificação da matriz, foi usado 2,5 g de amostra de ração branco.

A linearidade foi expressa pelo coeficiente de regressão linear (r) da curva analítica, sendo também avaliada a distribuição dos resíduos (erros) de cada ponto de concentração avaliado.

A seletividade do método foi avaliada de duas formas. Primeiro, pela comparação dos cromatogramas obtidos para a amostra branco e para a amostra branco fortificada com o fármaco, verificando a eventual presença de interferentes da matriz que pudessem estar coeluyendo com os analitos. Em segundo, avaliou-se o efeito matriz pela comparação da curva analítica obtida com os analitos em solução, com a curva analítica obtida a partir do extrato fortificado com os analitos em concentrações equivalentes às da curva em solução. Os resultados de efeito matriz foram obtidos a partir da quantificação do extrato fortificado nos níveis citados, através do emprego da equação da curva analítica do analito em solução, e expressos em porcentagem do valor esperado subtraído de 100%.

O efeito residual (*carry over*) pode ser definido como um aumento de concentração em uma amostra, proveniente de resíduos da amostra injetada anteriormente. Esse efeito foi avaliado a partir da análise de amostra branco, logo após a análise de amostra branco fortificada com o analito nos limites lineares superiores de concentração para cada uma das amostras de ração.

A avaliação da precisão foi dividida em duas etapas (intradia e interdias). A precisão intradia foi avaliada usando amostras fortificadas. Para as amostras fortificadas, a precisão intradia foi avaliada em três diferentes níveis de concentração de EMA-B1a na ração (50, 100, 150 ng/g).

Todo o procedimento foi realizado em triplicata ($n=3$) para cada nível de concentração, em um mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e expresso como coeficiente de variação (CV, %). A precisão interdias foi avaliada para os mesmos três níveis de concentração descritos para a precisão intradia, no entanto, as repetições foram realizadas em três dias diferentes ($n=3$). As análises foram realizadas pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento e os resultados foram expressos pelo coeficiente de variação (CV, %).

A exatidão do método foi avaliada mediante teste de recuperação. Para tanto, uma solução contendo EMA-B1a foi utilizada para a fortificação de amostras branco de ração, nos mesmos três níveis de concentração empregados na avaliação da precisão, com três repetições, uma em cada dia, ($n=3$), interdias, e três repetições, no mesmo dia, ($n=3$), intradia. Os resultados foram calculados como porcentagens obtidas das concentrações dos analitos empregados na fortificação, e expressos na forma de faixas.

Como critérios de aprovação quanto aos parâmetros de precisão e exatidão, segundo o guia do MAPA (2011), tem-se a Tabela 3.

Tabela 3 - Critérios para aprovação dos parâmetros de precisão e exatidão conforme o guia do MAPA (2011).

Concentração de EMA-B1a	Precisão (CV, %)	Faixa de Exatidão (Rec, %)
< 1 ng/g	35	50 a 120
≥ 1 ng/g < 10 ng/g	30	70 a 110
≥ 10 ng/g < 100 ng/g	20	80 a 110
≥ 100 ng/g	15	80 a 110

3.2.4 Método analítico para determinação do fármaco em filé de tilápia

3.2.4.1 Extração de EMA-B1a do filé de tilápia

Para a extração de EMA-B1a a partir de amostras de filé de tilápia (músculo e pele em proporção natural), foram tomadas como referência inicial do método, as condições empregadas por (LOPES *et al* 2012) que utilizou o método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) para a extração simultânea de 32 fármacos, inclusive o benzoato de emamectina, a partir da carne de peixes. Considerada a reconhecida versatilidade do método QuEChERS, optamos por esse procedimento a compor o método do presente estudo.

Para tanto, porções de cinco gramas de amostra biológica de filé de tilápia homogeneizada, foram colocadas em tubos de polipropileno, onde também se adicionou 5 mL de acetonitrila como fase extratora, seguido de agitação em vortex por 30 segundos e em mesa agitadora horizontal, por 15 min. Em seguida, adicionou-se dois gramas de sulfato de magnésio anidro e um grama de acetato de sódio para se reduzir o volume da fase aquosa, além de sua reação de hidratação ser uma reação exotérmica, favorecendo a extração de substâncias apolares (ANASTASSIADES, M. *et al*, 2003). Essa mistura foi, então, agitada em vortex por 30 segundos e em mesa agitadora por 15 min, e posteriormente centrifugada a 2900 *g* por 10 min. Na sequência, retirou-se uma alíquota de 1 mL do sobrenadante para a realização da etapa de limpeza, à qual adicionou-se 25 mg de PSA, 25 mg de C₁₈ e 150 mg de sulfato de magnésio, com posterior agitação em vórtex por 30 segundos, seguida de centrifugação a 2900 *g* por 10 min. A solução foi, então, filtrada através de uma membrana com poros de tamanho 0,2 µm, sendo transferido um volume de 1000 µL para o vial, em seguida, um volume de 5 µL foi injetado no sistema LC-MS/MS.

3.2.4.2 Condições do sistema LC-MS/MS para análise do filé de tilápia

As condições de operação do sistema LC-MS/MS para as análises das amostras de filé de tilápia foram as mesmas já descritas para as análises na ração, porém, para a confirmação da identidade da EMA-B1a também foi monitorada a transição m/z 887 > 126.

3.2.4.3 Avaliação de desempenho analítico do método desenvolvido para filé

Depois de estabelecidas as condições do método analítico para determinação de resíduos da EMA-B1a em filé de tilápia, procedeu-se a avaliação de desempenho analítico do método a partir dos parâmetros linearidade, seletividade (efeito matriz), precisão e a exatidão. Para tanto, foi tomado como referência o guia de validação analítica recomendado pela agência Food and Drugs Administration (FDA) através do International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH) voltado para “Validação de Métodos Analíticos Usados em Estudos de Depleção Residual” (VICH-FDA, 2015).

Para avaliação da linearidade em filé de tilápia, a curva analítica utilizada para a quantificação de EMA-B1a foi elaborada fortificando amostras branco de filé de tilápia em oito níveis de concentração: 1, 10, 40, 70, 100, 130, 160, 200 ng/g. Para a fortificação da matriz, foram usados 5,0 g de amostra branco de filé de tilápia. A linearidade foi expressa pelo coeficiente de regressão linear (r) da curva analítica, sendo também avaliada a distribuição dos resíduos (erros) de cada ponto de concentração avaliado.

A seletividade do método foi avaliada de duas formas. Primeiro, pela comparação dos cromatogramas obtidos para a amostra branco e para a amostra branco fortificada com o fármaco, verificando a eventual presença de interferentes da matriz que pudessem estar coeluyendo com os analitos. Em segundo, avaliou-se o efeito matriz pela comparação da curva analítica obtida com os analitos em solução, com a curva analítica obtida a partir do extrato fortificado com os analitos em concentrações equivalentes às da curva em solução. Os resultados de efeito matriz foram obtidos a partir da quantificação do extrato fortificado nos níveis citados, através do emprego da equação da curva analítica do analito em solução, e expressos em porcentagem do valor esperado subtraído de 100%.

O efeito residual (*carry over*) pode ser definido como um aumento de concentração em uma amostra, proveniente de resíduos da amostra injetada anteriormente. Esse efeito foi avaliado a partir da análise de amostra branco, logo após a análise de amostra branco fortificada com o analito nos limites lineares superiores de concentração para a amostra de filé de tilápia.

O Limite de Detecção (LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada pelo método desenvolvido. O LD para a determinação de EMA-B1a no filé de tilápia foram estimados através da fórmula $LD = DP \times 3/S$, onde DP é o desvio padrão da resposta de dez replicatas do extrato

branco e S é o coeficiente angular (inclinação) da curva analítica obtida para o filé de tilápia.

O Limite de Quantificação (LQ) é a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis. O LQ foi estimado através da fórmula: $LQ = 10 \times DP/S$, onde DP é o desvio padrão da resposta de dez replicatas do extrato branco e S é coeficiente angular (inclinação) da curva analítica obtida para o filé de tilápia. Depois de estimado, o LQ foi avaliado quanto à precisão e exatidão, os quais deveriam atender aos seguintes critérios:

- Precisão do LQ: Para concentrações menores que 1ng/g, 30% (CV%) para a precisão intradia e 45% (CV%) para a precisão interdias.
- Exatidão do LQ: Para concentrações menores que 1ng/g, os valores de referência em porcentagem de recuperação são de -50% e +20%.

A avaliação da precisão do método foi dividida em duas etapas (intradia e interdias). A precisão intradia foi avaliada a partir de triplicatas (n=3) de análises de amostras branco fortificadas com EMA-B1a em três níveis de concentração (40, 100 e 160 ng/g), sendo o padrão interno (fenacetina) mantido à concentração de 300 ng/g. As análises foram realizadas em um mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e expressas como coeficiente de variação (CV, %) para cada nível de concentração avaliado.

A precisão interdias foi avaliada para os mesmos três níveis de concentração descritos para a precisão intradia, no entanto, as repetições foram realizadas em três dias diferentes (n=3). As análises foram realizadas pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento e os resultados foram expressos pelo coeficiente de variação (CV, %) para cada nível de concentração avaliado.

A exatidão do método foi avaliada mediante testes de recuperação a partir de amostras branco fortificadas. Para tanto, uma solução contendo EMA-B1a foi utilizada para a fortificação de amostras branco, nos mesmos três níveis de concentração empregados na avaliação da precisão, com três repetições, uma em cada dia, (n=3), interdias, e três repetições, no mesmo dia, (n=3), intradia. Os resultados foram calculados como porcentagens obtidas das concentrações dos analitos empregados na fortificação, e expressos na forma de faixas.

Como critérios de aprovação quanto aos parâmetros de precisão e exatidão, segundo o guia VICH-FDA (2015), tem-se a Tabela 4.

Tabela 4 - Critérios para aprovação dos parâmetros de precisão e exatidão conforme o guia VICH-FDA (2015).

Concentração de EMA-B1a	Precisão Intradia (CV, %)	Precisão Interdias (CV, %)	Faixa de Exatidão (Rec, %)
< 1 ng/g	30	45	50 a 120
≥ 1 ng/g < 10 ng/g	25	32	60 a 120
≥ 10 ng/g < 100 ng/g	15	23	70 a 110
≥ 100 ng/g	10	16	80 a 110

3.2.5 Estudo de depleção residual e estimativa de período de carência

O estudo de depleção residual teve como objetivo avaliar o perfil de eliminação do resíduo de EMA-B1a, que é o homólogo marcador do benzoato de emamectina, em filé de tilápia (músculo e pele em proporção natural) após a administração oral do antiparasitário, via ração, e estimar, ao final, o período de carência mínimo a ser recomendado.

A forma de fornecimento ocorreu a partir de uma ração comercial disponível no mercado da marca Guabi®, prescrita para peixes em fase de terminação, que foi previamente incorporada com benzoato de emamectina, conforme procedimento já descrito.

Os peixes da espécie tilápia com peso vivo médio de 400 g, comprados da Piscicultura Jatobá (Igarapava - SP), foram aclimatados às instalações do Centro de Aquicultura da Unesp (Jaboticabal – SP), alocados em caixas de 310 L (10 animais por caixa). A água das caixas foi aerada e renovada constantemente (Figura 2). Parâmetros de qualidade de água (temperatura, pH, oxigênio dissolvido) foram monitorados para mantê-los dentro de níveis aceitáveis (tabela 5). A composição do medicamento a ser administrado através da ração foi de 5 mg de benzoato de emamectina para cada kg de ração, levando em consideração uma taxa de

alimentação diária de 1% do peso vivo, sendo a dose de tratamento a ser administrada de 50 µg de emamectina por kg de peso corporal por dia, durante 7 dias consecutivos.

Figura 2 - Caixas de 310 litros utilizadas no experimento

Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos da água

Dias	Parâmetros físico-químicos da água		
	Temperatura (°C)	pH	Oxigênio (mg L ⁻¹)
1	29,8	7,6	6,78
2	29,9	7,4	6,32
3	29,8	7,3	7,31
4	29,3	7,4	6,64

Após o tratamento com a ração medicada, grupos de 10 peixes (10 replicatas) foram abatidos em 7 tempos diferentes. Os períodos avaliados foram de 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 horas.

Os peixes sofreram eutanásia com administração de benzocaína por imersão, método recomendado pelo Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais (CFMV, 2013).

Após o abate, os filés foram retirados (figura 3), embalados em sacos plásticos apropriados para congelamento, identificados e estocados em freezer a temperatura de -20 °C até as análises em LC-MS/MS, em período não superior a um mês.

Figura 3 - Fotografias em sequência dos procedimentos para retirada dos filés

Após o tratamento com o benzoato de emamectina, os peixes voltaram a receber a ração isenta do fármaco.

O desenvolvimento deste estudo foi aprovado e realizado em acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP – Campus de Jaboticabal-SP, protocolo nº019032/17(Anexo I).

A partir da análise dos resultados dessas amostras, foi obtida a curva de depleção residual, a qual foi avaliada para a estimativa de um período de carência mínimo a ser recomendado para a tilápia, nas condições de cultivo empregadas.

Para a estimativa do período de carência, foi utilizado como referência o LMR estabelecido para a EMA-B1a, que é o homólogo marcador, em filé de peixe, recomendado pelo Codex Alimentarius, no valor de 100 µg/kg. O experimento, bem como o tratamento dos dados para estimativa do período de carência, foi conduzido conforme outros estudos já realizados pelo responsável pelo presente projeto (PASCHOAL et al., 2011 e 2013).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Método analítico para a ração

4.1.1 Avaliação de desempenho analítico do método desenvolvido para ração

4.1.1.1 Linearidade

Para avaliação da linearidade, a curva analítica utilizada para a quantificação de EMA-B1a foi elaborada fortificando amostras branco da ração em cinco níveis de concentração: 10, 25, 50, 100, 150 ng/g como mostra a figura 4.

Figura 4 - Curva analítica para a determinação da EMA-B1a na ração e seu respectivo gráfico de distribuição de resíduos (erros).

A curva analítica apresentou um coeficiente de regressão linear (r) superior a 0,99 demonstrando que o método é linear e o gráfico de distribuição de resíduos não demonstra perfil de tendência.

4.1.1.2 Seletividade

A seletividade foi avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito era proveniente exclusivamente da presença do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra. A Figura 5 ilustra a comparação dos

cromatogramas obtidos a partir da amostra branco da ração e da amostra branco da ração fortificada com benzoato de emamectina na concentração equivalente ao menor ponto da curva analítica (10 ng/g), onde se comprova a seletividade do método frente à ausência de interferentes para ambos os casos.

Figura 5 - Comparação entre os cromatogramas da amostra branco de ração fortificada (A) com benzoato de emamectina à concentração de 10 ng/g e (b) da amostra branco.

A avaliação do efeito Matriz consistiu em um estudo complementar de avaliação da seletividade do método, considerado muito importante quando se emprega a espectrometria de massas como técnica analítica, visando averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental. O método desenvolvido para a determinação de EMA-B1a na ração, não apresentou efeito de matriz significativo.

4.1.1.3 Precisão e Exatidão

A precisão expressa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado mais de uma vez em uma amostra homogênea, em idênticas condições de análise.

A precisão foi realizada com análise de amostras em triplicata realizadas no mesmo dia (precisão intradia) e pelo mesmo analista; e por análise de amostras realizadas em três dias diferentes (precisão interdias), pelo mesmo analista nas mesmas condições nas mesmas concentrações do teste anterior, nas concentrações de 50, 10 e 150 ng/g.

Já a exatidão de um método analítico, expressa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão está intimamente ligada ao erro sistemático do método analítico e a recuperação do analito medida em porcentagem de recuperação.

A exatidão foi realizada com análise de amostras em triplicata realizadas no mesmo dia e pelo mesmo analista (exatidão intradia) e por análise de amostras realizadas em três dias diferentes, pelo mesmo analista nas mesmas condições (exatidão interdias) nas concentrações empregadas na avaliação da precisão.

Os resultados obtidos de precisão e exatidão do método analítico para a determinação de EMA-B1a na ração são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados de precisão e exatidão do método para a determinação de EMA-B1a na ração.

Concentração de EMA-B1a	Precisão Intradia, n=3 (CV, %)	Precisão Interdias, n=3 (CV, %)	Exatidão Intradia, n=3 (Rec, %)	Exatidão Interdias, n=3 (Rec, %)
50 ng/g	1,2	2,5	104	100
100 ng/g	2,3	0,6	100	100
150 ng/g	1,5	0,6	99	100

Os resultados obtidos então dentro dos preconizados como aceitos para um método adequado ao fim pretendido, segundo o Guia de Validação e Controle de

Qualidade Analítica para Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários, elaborado pela Coordenação Geral de Apoio Laboratorial da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011).

4.1.1.4 Efeito residual (carry over)

Não foi encontrado efeito *carry over* significativo para o método empregado (<LQ).

4.1.2 Eficiência de extração da EMA-B1a da ração

O método de extração foi avaliado pela eficiência de extração de EMA-B1a (expressa em porcentagem). Para tanto, as concentrações do analito nas amostras branco de ração fortificadas foram determinadas após análise, empregando-se a curva analítica obtida com os analitos em solvente. Considerando que não houve efeito matriz significativo durante a avaliação da seletividade do método, obteve-se como resultado da eficiência, o valor aproximado de 101%, demonstrando que o método de extração é altamente eficiente.

4.2 Avaliação do processo de incorporação do benzoato de emamectina na ração

Quanto ao nível de concentração de benzoato de emamectina a ser incorporado na ração, utilizou-se a dosagem indicada pelo fabricante do medicamento Slice® de 50 µg/kg/dia.

Para o tratamento das tilápias, pesando em média 400 g cada, utilizadas no estudo, levou-se em consideração uma taxa alimentar diária de 1% de ração em relação ao peso corpóreo, e, portanto, foram adicionados 5 mg de benzoato de emamectina por kg de ração.

Após a avaliação do método para a determinação de EMA-B1a na ração, procedeu-se a análise para a quantificação do fármaco. O resultado obtido demonstrou que houve uma perda de aproximadamente 20% do fármaco durante o processo de revestimento. Então, para se garantir a dosagem correta do fármaco, fez-se a adição de 6 mg de benzoato de emamectina na suspensão utilizada durante o

processo de revestimento.

Tabela 7 - Análise da ração preparada com benzoato de emamectina.

Replicatas	Concentração de EMA-B1a (µg/kg)	Média	CV (%)
1	51,47	51,89	2,1
2	53,12		
3	51,08		

4.3 Ensaio de lixiviação do fármaco da ração

O processo de lixiviação é um aspecto muito importante a ser analisado quando se administra o fármaco através da ração, pois pode haver a contaminação do ambiente aquático e também o comprometimento do tratamento devido à perda do fármaco para a água. Recomenda-se que a ração fique disponível na água por um tempo de pelo menos dez minutos (CANTELMO,2002) até ser consumida pelos animais. Dessa forma, verificar as possíveis perdas do fármaco por lixiviação nesse período é um critério importante de avaliação do processo de incorporação do fármaco na ração.

Nos ensaios realizados para avaliação deste parâmetro, não se verificou perda do analito para a água por um período de até 20 minutos, nas três faixas de pH avaliados.

Portanto, o revestimento da ração, nesse caso com o polímero de etilcelulose, se mostrou útil para evitar possíveis perdas do analito da ração para a água, o que poderia comprometer o tratamento medicamentoso ou aumentar o risco de poluição ambiental com o fármaco.

O ensaio de lixiviação demonstrou que o revestimento da ração com o polímero de etilcelulose é uma estratégia promissora, já que em nenhuma das triplicatas, nas três diferentes faixas de pH e nos quatro intervalos de tempo a resposta analítica foi maior que o limite de quantificação.

4.4 Método analítico para o filé de tilápia

4.4.1 Método de extração da EMA-B1a do filé de tilápia

Trabalhos mais recentes têm utilizado o método QuEChERS e suas modificações para extração de medicamentos veterinários em matrizes de origem animal. Devido a sua rapidez, facilidade de execução, baixo custo, eficiência e robustez, esse método foi escolhido para a determinação de FNC EMA-B1a em filé de peixe.

Como etapa inicial de preparo de amostra, fez-se uso de um processador de alimentos para se obter uma melhor homogeneidade da amostra e para promover o rompimento mecânico das paredes celulares do tecido biológico, visando contribuir para o acesso da solução extratora ao conteúdo intra e intercelular.

Como condição base de partida para o desenvolvimento do método, estabeleceu-se primeiramente a quantidade de 10 g de amostra. Duas composições diferentes da solução extratora foram avaliadas: (i) 10 mL de ACN pura; e (ii) mistura de ACN e metanol (75:25, v/v). Foi observado que o uso da solução extratora composta por ACN pura, proporcionou um extrato mais límpido e também aumentou a eficiência de extração. Prestes et al. (2009) sugerem que o uso de ACN como solvente proporciona a extração de uma ampla faixa de compostos com diferentes polaridades e reduz a quantidade de extrativos lipofílicos provenientes da matriz, tais como gorduras e pigmentos.

Visando avaliar a possibilidade de diminuirmos o consumo de solventes orgânicos, foi realizado um teste de diminuição do volume da solução extratora para 5 mL e a quantidade de amostra para 5 g, mantendo-se, assim, a proporção de 1:1 (m/v) entre a quantidade de amostra e o volume de solução extratora. Como resultado, obteve-se equivalente eficiência de extração do método e significativa economia de solvente e de amostra.

O método de QuEChERS original emprega procedimento de agitação manual ou com auxílio de agitadores do tipo *vortex* por um período de 1 minuto. Contudo, acreditando-se favorecer uma melhor ação da solução extratora na amostra, a agitação foi realizada por *vortex* (30 segundos), seguida por 15 minutos de agitação em mesa agitadora horizontal.

A escolha do sulfato de magnésio, na etapa de partição, se deu com base na sua capacidade em remover a água presente na matriz (filé de peixe), reduzindo o

volume da fase aquosa. Além disso, a hidratação do sulfato de magnésio se dá mediante uma reação exotérmica, o que favorece a extração de compostos apolares.

O uso do acetato de sódio aumentou a eficiência de extração, quando comparado com o cloreto de sódio, passando-se de 92% para aproximadamente 100%.

Para a etapa de limpeza dos extratos, foi considerado o uso de dois sorventes (C_{18} e PSA) e do sal sulfato de magnésio, diminuindo consideravelmente os interferentes da matriz, gerando um extrato visivelmente mais límpido, pode-se notar também que ao final da rotina diária de análises, o sistema de injeção do espectrômetro de massas permaneceu limpo, diminuindo a necessidade de manutenções técnicas de limpeza do sistema de injeção, sendo que o sorvente C_{18} não interferiu na eficiência de extração, mesmo o analito sendo apolar.

4.4.2 Avaliação de desempenho analítico do método desenvolvido para filé de tilápia

4.4.2.1 Linearidade

Para avaliação da linearidade, a curva analítica utilizada para a quantificação de EMA-B1a elaborada fortificando amostras branco de filé de tilápia em oito níveis de concentração: 1, 10, 40, 70, 100, 130, 160 e 200 ng/g, como mostra a figura 6.

Figura 6 - Curva analítica para a determinação da EMA-B1a em filé de tilápia e seu respectivo gráfico de resíduos.

A curva analítica apresenta um coeficiente de regressão linear (r) superior a 0,99 demonstrando que o método é linear e o gráfico de distribuição de resíduos não demonstra perfil de tendência.

4.4.2.2. Seletividade

A comparação dos cromatogramas obtidos para a amostra branco de filé de tilápia e a amostra branco fortificada com a emamectina e seus metabólitos na concentração de 100 ng/g, conforme figura 7, comprova a seletividade do método desenvolvido. Considerando-se a utilização da espectrometria de massa como instrumento analítico no presente método, foi avaliado o efeito matriz. No entanto, não se observou qualquer efeito significativo.

Figura 7 - Comparação entre o cromatograma da amostra branco de carne fortificada (A) com benzoato de emamectina e o cromatograma da amostra branco (B).

4.4.2.3 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O resultado estimado para LD foi de 0,3 ng/g e para o LQ foi de 1 ng/g, com precisão (expressa como Coeficiente de Variação) de 9,9% LQ e exatidão (expressa na forma de recuperação) de 100,8% para LQ.

4.4.2.4 Precisão e Exatidão

A precisão foi realizada com análise de amostras em triplicata realizadas no mesmo dia (precisão intradia) e pelo mesmo analista; e por análise de amostras realizadas em três dias diferentes (precisão interdias), pelo mesmo analista nas mesmas condições nas mesmas concentrações do teste anterior, nas concentrações de 40, 100 e 160 ng/g.

Já a exatidão foi estimada a partir de análise de amostras em triplicata realizadas no mesmo dia e pelo mesmo analista (exatidão intradia) e por análise de amostras realizadas em três dias diferentes, pelo mesmo analista nas mesmas condições (exatidão interdias) nas concentrações empregadas na avaliação da precisão.

Os resultados obtidos de precisão e exatidão do método analítico para a determinação de EMA-B1 na ração são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados de precisão e exatidão do método para a determinação de EMA-B1a em filé de tilápia.

Concentração de EMA-B1a	Precisão Intradia, n=3 (CV, %)	Precisão Interdias, n=3 (CV, %)	Exatidão Intradia, n=3 (Rec, %)	Exatidão Interdias, n=3 (Rec, %)
40 ng/g	2,6	1,8	97	98
100 ng/g	2,7	1,1	98	99
160 ng/g	3,7	5,6	102	101

Os resultados obtidos então dentro dos preconizados como aceitos para um método adequado ao fim pretendido, segundo o guia de validação analítica recomendado pela agência Food and Drugs Administration (FDA) através do International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH) voltado para “Validação de Métodos Analíticos Usados em Estudos de Depleção Residual” (VICH-FDA, 2015).

4.4.2.5 Efeito residual (*carry over*)

Não foi encontrado o efeito *carry over* (<LQ) para as amostras de filé de tilápia.

4.5 Estudo de depleção residual

A espécie de peixe empregada no ensaio de depleção residual foi a tilápia, principalmente pela fácil adaptação, boas taxas de crescimento e por ser a espécie de peixe mais cultivada em aquicultura no Brasil. Por essas razões e devido à falta de informações sobre o metabolismo da EMA-B1a em espécies diferentes dos salmonídeos, a tilápia foi escolhida como modelo biológico desse experimento.

As concentrações médias de EMA-B1a determinadas nas amostras analisadas dos peixes, conforme os diferentes períodos de abate após a medicação estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentrações médias de EMA-B1a na carne de tilápia nos diferentes períodos de abate após a medicação dos peixes.

Replicatas	Concentração de EMA-B1a (ng g ⁻¹)						
	Período de abate após o tratamento com o fármaco						
	6 horas	12 horas	24 horas	36 horas	48 horas	60 horas	72 horas
1	4,40	7,67	2,76	2,79	3,05	1,20	1,15
2	6,74	2,85	3,72	2,03	3,50	<LQ	4,62
3	4,30	2,41	5,00	2,80	<LQ	1,66	<LD
4	4,11	2,31	2,74	2,20	<LQ	6,68	1,67
5	9,87	3,12	4,55	5,64	1,44	1,10	1,63
6	2,78	4,59	3,97	1,12	<LQ	<LQ	<LQ
7	4,08	3,56	2,30	2,42	2,57	<LQ	<LD
8	6,99	4,57	4,23	1,15	1,04	<LD	<LD
9	13,25	2,06	3,86	4,10	<LQ	3,32	1,60
10	8,16	3,54	10,53	1,58	<LD	2,07	<LD

LD: Limite de Detecção (0,3 ng/g); LQ: Limite de Quantificação (1 ng/g).

A eliminação terminal de um fármaco a partir de um tecido biológico (filé, por exemplo), fase identificada como depleção residual, em muitos casos segue o modelo de um compartimento (EMEA, 1995).

Mediante o emprego do programa computacional GraphPadPrism® (versão 5.0), o modelo matemático não linear que melhor se ajustou para descrever o perfil de depleção obtido do resíduo marcador (EMA-B1a) foi o de decaimento de primeira ordem, conforme apresentado na Figura 8, sendo os parâmetros de ajustes do modelo estão descritos na Tabela 10.

Figura 8 - Gráfico da curva de depleção residual da EMA-B1a a partir do modelo matemático de ajustes não lineares adotado.

Tabela 10 - Parâmetros do ajuste do modelo matemático não linear para a curva de depleção residual da EMA-B1a

Parâmetros de ajuste não linear EMA-B1a	
Graus de liberdade	53
Coefficiente linear (r^2)	0,28
Soma absoluta dos quadrados	245
Desvio (Sy.x)	2,15

As análises da regressão linear dos dados cinéticos descrevem a depleção terminal de um resíduo marcador adequado, permitindo a estimação do período de carência, tomando-se como referência o LMR estabelecido para o marcador e o tecido alvo em questão. O período de carência é estimado quando o limite de tolerância da concentração residual se encontra abaixo do valor de LMR. O limite de tolerância fornece um intervalo no qual se localiza um percentil da população com um nível de confiança. A FDA recomenda empregar 99% de percentil e 95% de confiança para essa avaliação.

Para estimar o período de carência mínimo, a FDA recomenda modelar a curva de depleção no sentido de gerar uma reta a partir da transformação dos dados de concentração em função logarítmica. Assim sendo, procedeu-se a regressão linear da fase terminal de depleção da EMA-B1a a partir das concentrações obtidas transformadas pela função logarítmica neperiana ($\ln$), sendo o gráfico resultante apresentado na Figura 9. Os parâmetros de ajuste linear para o gráfico de regressão estão descritos na Tabela 11.

Figura 9 – Gráfico da curva de depleção residual da EMA-B1a a partir da regressão linear. LMR: Limite Máximo de Resíduo; (a): reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%.

Tabela 11 - Parâmetros do ajuste da regressão linear da curva de depleção residual da EMA-B1a.

Parâmetros de ajuste linear	EMA-B1a
Coeficiente de regressão	-0,01595 ± 0,003174
Y-intercepto	1,628 ± 0,1196
X-intercepto	102,1
Coeficiente de regressão ⁻¹	-62,70

Para cada período avaliado, 10 unidades de peixes foram abatidas (n=10). No entanto, para a avaliação dos resultados, apenas os animais com concentração de EMA acima do LQ do método (1 ng g⁻¹) foram considerados, já que o logaritmo neperiano de valores ≤ 1 são ≤ 0 .

Para comprovar a validade da regressão linear, é importante verificar se há homogeneidade das variâncias a partir dos dados de concentração transformados na função logarítmica para cada período de abate e a se a distribuição dos erros de ajuste ocorre de forma normal (teste de normalidade).

A avaliação da homogeneidade dos dados obtidos foi realizada pelo teste da análise da variância, cujos resultados estão sumarizados na Tabela 12.

Tabela 12 - Análise da variância para avaliação da homogeneidade das variâncias.

Fonte da variação	GL	SS	MS	F calculado	F tabelado	Parecer
entre grupos	5	0,359	0,072	1,556	2,404	n.s.
no grupo	49	2,260	0,046			

n.s.: não significativo

A dispersão dos resultados das análises entre os peixes abatidos em um mesmo tempo de avaliação (mesmo grupo), ou mesmo, entre os diferentes grupos (abatidos em tempos diferentes), é influenciada pelo número de indivíduos (n) empregados no ensaio experimental, assim como, pela rota de administração da medicação empregada. Como os peixes receberam a medicação através da ração, ocorre uma competição natural pelo alimento entre os animais, o que poderia

promover diferenças na ingestão do fármaco entre eles. Para tanto, a separação dos animais em caixas contendo 10 indivíduos cada permitiu uma melhor condição de manejo experimental e pode ter contribuído para que a homogeneidade dos resultados estivesse dentro da aceitação, conforme revelou o teste da análise da variância.

A Figura 10 refere-se à distribuição dos erros residuais a partir do qual pode-se avaliar se há falta de ajuste do modelo linear proposto.

Figura 10 – Gráfico de distribuição normal dos erros do ajuste da regressão linear.

A verificação da distribuição dos erros residuais de ajuste no gráfico da Figura 10 não aponta grau importante de significância de desvio da normalidade, qualificando o modelo de regressão linear como adequado para a avaliação dos dados de depleção residual obtidos.

Como pode ser observado, desde o primeiro tempo de abate avaliado, as concentrações de EMA-B1a se mantiveram sempre abaixo do LMR de 100 ng/g tomado como referência. Portanto, os resultados obtidos indicam que não há necessidade da recomendação de período de carência em caso do emprego do benzoato de emamectina nas condições empregadas no presente estudo.

No entanto, vale destacar um fator importante relacionado ao consumo da ração medicada pelos peixes que foi observado durante a execução do experimento e que pode ter influenciado significativamente nos resultados obtidos.

Antes de se iniciar o experimento com a ração medicada, foi realizado um período de adaptação dos peixes com o consumo da ração contendo apenas o revestimento polimérico (isenta do fármaco) durante 4 dias, para se verificar a aceitação dos animais quanto a ração revestida. Até então, o consumo foi considerado normal, quando comparado com o consumo da ração comercial sem qualquer procedimento de alteração previsto no presente estudo.

Destaca-se que a dosagem de tratamento prevista era de 50 µg/kgPV/dia, o que é expressivamente menor quando comparada a outros medicamentos antiparasitários, como o albendazol (10 mg/kgPV/dia), por exemplo. Dessa forma, esperava-se não haver significativa influência na aceitação de consumo por parte dos peixes após a adição da EMA. Porém, durante o tratamento com a ração medicada, constatou-se menor aceitação da ração pelos peixes. Baseado no acompanhamento visual do consumo de ração medicada, estimou-se que o consumo diário nos dias de medicação variou entre 70 e 100%.

Whyte et al. (2011) realizaram um estudo, onde se comparou a depleção residual da EMA-B1a em músculo e pele de salmão, cultivados na temperatura de 10°C, mantidos em tanques com recirculação de água natural do mar, tratados em duas dosagens diferentes (50 µg/kg/dia e 100 µg/kg/dia), durante sete dias consecutivos. Os tempos de abate variaram de 1 a 45 dias, após o tratamento. Em nenhuma das condições avaliadas o resíduo de EMA-B1a ultrapassou o limite máximo de resíduo.

Roy et al. (2006) estudaram a depleção residual de EMA-B1a em filés de trutas arco-íris em duas temperaturas de água diferentes, 6°C e 15°C, e os tempos de abate variaram de 6 horas a 77 dias, após o tratamento, na dosagem de 50 µg/kg/dia durante sete dias consecutivos. Em nenhuma das temperaturas estudadas o resíduo de EMA-B1a ultrapassou o limite máximo de resíduo. A depleção residual aconteceu mais rapidamente na temperatura de 15°C, o que demonstra que o metabolismo do peixe é influenciado pela temperatura da água.

Dessa forma, consideramos os resultados obtidos compatíveis com o esperado a partir dos estudos já divulgados na literatura científica, isto é, sem ocorrer a presença

residual de EMA-B1a em níveis acima do LMR. Esse resultado parece ser principalmente devido à dose de tratamento ser baixa.

5. CONCLUSÕES

O processo de revestimento da ração com a suspensão contendo o benzoato de emamectina e o polímero de etilcelulose mostrou-se muito promissor, principalmente devido à uniformidade da ração medicada, o que altamente contribui para um melhor controle em relação à dose de tratamento a ser administrada para os peixes. Além disso, o processo permite que os péletes de ração mantenham sua característica de fluabilidade, o que contribui para uma melhor observação do consumo da ração medicada pelos peixes. Ainda, o procedimento de incorporação empregado evitou a lixiviação do fármaco para a água, conferindo alta qualidade ao processo, diminuindo inclusive os riscos de contaminação do meio ambiente.

Os métodos analíticos desenvolvidos para a quantificação de EMA-B1a, tanto no filé de tilápia quanto na ração medicada, apresentaram resultados satisfatórios de confiabilidade analítica, cujos parâmetros de conformidade avaliados se mostraram adequados conforme os guias de validação analítica adotados como referência.

O ensaio com os peixes da espécie tilápia permitiu estabelecer curvas de depleção da EMA-B1a no filé dos peixes, as quais se ajustaram a um modelo exponencial de primeira ordem. Os resultados desse estudo demonstram que a espécie de peixe tilápia, após administração oral de dose 50 µg/kgPV/dia durante sete dias consecutivos, não resultou em resíduos acima do LMR, de modo que não indica a necessidade de estabelecimento de um período de carência mínimo para este fármaco.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENK, F. J., *J. AOAC Int.* 2003, 83, 412.

ARENA J.P.; LIU K.K.; PARESS P.S.; FRAZIER E.G.; CULLY D.F.; MROZIK H. & SCHAEFFER J.M. (1995) The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*, correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current membrane binding and biological activity. *Journal of Parasitology* 81, 286±294.

BOGIALLI, S. & DI CORCIA, A. Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 395, p.947–966, 2009.

BORDON, V.F. Pesquisa de genes de Resistencia a antimicrobianos em filés de tilápia comercializados no município de São Paulo-SP. Dissertação (Mestrado em Serviços de Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, SP, 2014.

BRASIL. Instrução Normativa N° 11 de 07 de maio de 2014. Dispõe sobre o Subprograma de Monitoramento em carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), mel, leite, ovos e pescado para o exercício de 2014, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010. Brasília: MPA, 2010. 128p.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. Brasília: MPA, 2011. 60p.

BUSATTO, Z.; FRANÇA, W. G.; CYRINO, J. E. P. PASCHOAL, J.A.R. (2017). Assessment of elimination profile of albendazole residues in fish, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35:1, 77-85.

CANTELMO, O. A. et al. Características físicas de dietas para peixes confeccionadas com diferentes aglutinantes. *Acta Scientiarum*, v. 24, n.4, p. 949–955, 2002.

CODEX ALIMENTARIUS. Maximum Residue Levels (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods.2015

CREPALDI, D.; FARIA, P.; TEIXEIRA, E.; RIBEIRO, L.; COSTA, A.A.; MELO, D.; CINTRA, A.; PRADO, S.; COSTA, F.A.; DRUMOND, M.; LOPES, V.; MORAES, V. Revista Brasileira Reprodução Animal, p 81-85, 2006.

DIAS, M. T. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Embrapa Amapá. 2009.

EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. 2006. *Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes*. 2ª Ed. Eduem, Maringá. 199 pp.

EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. 2010. *Diversidade dos parasitos de peixes de água doce do Brasil*. Clichetec, Maringá. 333 pp.

European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). Committee for Veterinary Medicinal Products. Note for guidance: approach towards harmonization of withdrawal periods (EMA/CVMP/036/95). 1995.

EMA – European Medicines Agency, EMA, Committee for Veterinary Medicinal Products, Emamectin (Extension to fin fish), EMA/MRL/863//03-FINAL, February, 2003.

FAO (2009) - Fisheries and aquaculture information and statistic service: 2007: Global aquaculture production: 1950-2007. Disponível em: <http://www.fao.org/figis>.

FAO. Food outlook: biannual report on global food markets. Rome: FAO, 2013. 134p.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2016. Rome: FAO, 2016. 200p.

FROESE, R.; PAULY, D. (Ed). FishBase. World Wide Web electronic publication. Version (12/2011).

FURLANETO, F.P.B., et al. Custo e rentabilidade da produção de tilápia (*Oreochromis spp.*) em tanques-rede no Médio Paranapanema, estado de São Paulo, safra 2004/05. Informações Econômicas, v.36, n. 3, p. 63-69, 2006.

GUIDELLI, G; TAVECHIO, W.L.G.; TAKEMOTO, R.M; PAVANELLI, G.C. 2011. Relative condition factor and parasitism in anostomid fishes from the floodplain of the Upper Paraná River, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 177: 145-151.

HASHIMOTO, J.C.; PASCHOAL, J.A.R.; QUEIROZ, J.F.; REYES, F.G.R. Considerations on the Use of Malachite Green in Aquaculture and Analytical Aspects of Determining the Residues in Fish: A Review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, v. 20, p. 273-294, 2011.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES Eighty-first meeting (Residues of veterinary drugs) Rome, 17–26 November 2015.

KUBITZA, F. (2000) Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. pp. 289. F. Kubitza; Jundiaí.

LEI FENG, BO CUI, DONGSHENG YANG, CHUNXIN WANG, ZHANGHUA ZENG, YAN WANG, CHANGJIAO SUN, XIANG ZHAO, HAIXIN CUI. Preparation and evaluation of emamectin benzoate solid microemulsion. Journal of Nanomaterials. Volume 2016.

LEONHARDT, J.H. Efeito da reversão sexual em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 1997. 128p. Tese de Doutorado (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, 1997.

LOPES, R. P; REYES, R. C.; GONZÁLEZ, R. R; VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G. Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B, p. 39-47, 2012.

LUQUE, J.L.; TAVARES, L.E.R. Checklist of Copepoda associated with fishes from Brazil. Zootaxa, v. 1579, p. 1-39, 2007.

MARTINS, M.L.; URBINATI, E.C. 1993. Rondonia rondoni Travassos, 1919 (Nematóda: Atractidae) parasite of *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae), in Brazil. Acta Veterinária, Jaboticabal, v.9(1)75-81.

MARTINS, M.L; ROMERO, N.G. 1996. Efectos del parasitismo sobre el tejido branquial en peces cultivados: Estudio parasitológico e histopatológico. *Revista Brasileira de Zoologia*, 13: 489-500.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Guia de Validação e Controle da Qualidade Analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários Brasília, DF: MAPA/ACS, 2011. 72 p.

MOREIRA, R. P. L. Desenvolvimento e validação de métodos multiresíduos para determinação de medicamentos veterinários em alimentos e em ração utilizando CL- EM/EM tese. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química; 2012.

OLIVEIRA, R. C. O Panorama da Aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, n. 2, v.1, p. 73-89, 2009.

ORTELLI D., COGNARD E., JAN P., EDDER P. J. Chromatogr B. v. 23, p. 2363–2374, 2009.

OSTRENSKI, A.; Borghetti, J. R. e Soto, D. (2008) - *Aqua-cultura no Brasil. O desafio é crescer*.

PASCHOAL, J.A.R. Resíduos de antimicrobianos em peixe: depleção residual e desenvolvimento de métodos analíticos. Tese (Doutorado em Química Analítica). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.

PASCHOAL, J.A.R.; REYES, F.G.R.; RATH, S.. Determination of quinolone residues in tilapias (*Oreochromis niloticus*) by HPLC-FLD and LC-MS/MS QToF. Food Additives and Contaminants, v. 26, p. 1331-1340, 2009.

PASCHOAL, J. A. R. ; REYES, F. G. R. ; RATH, S. ; BICUDO, Ã. J. A. ; CYRINO, J. E. P. Depletion study and estimation of the withdrawal period for oxytetracycline in tilapia cultured in Brazil. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics (Print), v. 35, p. 90-96, 2011.

PASCHOAL, J. A. R.; QUESADA, S. P.; GONÇALVES, L. U.; CYRINO, J. E. P.; REYES, F. G. R. Depletion study and estimation of the withdrawal period for enrofloxacin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics v. 36, p 594 - 602, 2013.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Eduem. Maringá. 1998.

PAVANELLI, G.; EIRAS, J.; TAKEMOTO, R. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Ed. UEM, p. 264, 2002.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. 2002. Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá, PR: EDUEM: NUPÉLIA, 2º ed., 305p.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. 2008. *Doença de peixes, profilaxia, diagnóstico e tratamento*. Eduem, Maringá. 311 pp.

RAE, G.H.,2000. A national treatment strategy for control of sea lice on Scottish salmon farms, Caligus6,2-3.

RICO, A.; PHU, T. M.; SATAPORNVANIT, K.; MIN, J.; SHAHABUDDIN, A. M.; HENRIKSSON, P. J. G.; MURRAY, F. J.; LITTLE, D. C.; DALSGAARD, A.; BRINK, P. J. V. Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major

internationally trated aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture*, p. 231 – 243, jul. 2013.

RICO, A.; SATAPORNVANIT, K.; HAQUE, M. M.; MIN, J.; NGUYEN, P. T.; TELFER, T. C.; BRINK, P. J. V. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review. *Reviews in Aquaculture*, p. 75 – 93, feb. 2012.

ROBERT, C.; GILLARD, N.; BRASSEUR, P.Y.; PIERRET, G.; RALET, N.; DUBOIS, M.; DELAHAUT, P. Food Additives and Contaminants A, v. 30, p. 443-457, 2013.

ROBERTS, T.T. e HUDSON, D.H.,1999. Methabolic Pathways of Agrochemicals, Part 2: Inseticides and Fungicides. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp 87-94.

ROTTA, M.A. e QUEIROZ. J.F. (2003) -Boas práticas de manejo (BPMs) para produção de peixes em tanques-redes. *Corumbá: Embrapa Pantanal*, v. 47, n. 12, p. 27.

ROY, W.J.; GILLAN, N.; CROUCH, L.; PARKER, R.; RODGER, H.; ENDRIS, R. (2006) – Depletion of Emamectin Residues Following Oral Administration To Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*. *Aquaculture* 259 (2006) 6-16.

SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURNS, V.; ALVES JÚNIOR, A.J. e MUNGIOLI, R. (2012) - Panorama da aquacultura no Brasil: desafios e oportunidades. *Agroindústria*, v. 35, p. 421-463.

SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURNS, V.; ALVES JÚNIOR, A.J.; MUNGIOLI, R. Panorama da aqicultura no Brasil: desafios e oportunidades. *BNDES Setorial*, v.35, p.421-463, 2012.

SMITH, S.; GIESEKER, C.; REIMSCHUESSEL, R.; DECKER, C.S.; CARSON, M.C. *Journal of Chromatography A*, v.1216m o, p. 8224-8232, 2009.

SOARES JÚNIOR, M.; CALIARI, M.; CHANG, Y. K. Substituição de farelos de soja por soja integral em rações extrusadas para aquicultura. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 34, p. 29-37, 2004.

TAVARES-DIAS et al. Distribution pattern of crustacean ectoparasites of freshwater fish from Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 24, n. 2, p. 136-147, 2015.

THATCHER, V.E. 1981. Patologia de peixes da Amazônia Brasileira, 1. Aspectos gerais. *Acta Amazonica*, 11(1):125-140.

THATCHER, V.E.; Jegú, M. 1996. Intestinal helminthes as population markers of the Amazonian fish *Mylesinus paraschomburgkii*, with descriptions of five new genera and seven new species of trematodes. *Amazoniana*, 14(1/2):143-155.

THATCHER, V.E. Aquatic Biodiversity in Latin America: Amazon Fish Parasites. Bulgaria: Pensoft, 2^a ed., . 509 p. 2006.

VAN DER HEEFT, E.; BOLCK, Y.J.C.; BEUMER, B.; NIJROLDER, A.W.J.M.; STOLKER, A A.M.; NIELEN, M.W.F. J Am Soc Mass Spectrom, v. 20, p. 451–463, 2009.

VICENTE, I.S.T. e FONSECA-ALVES, C.E. (2013) - Impact of Introduced Nile tilapia (*Oerochromis niloticus*) on Non-native Aquatic Ecosystems. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 16, n. 3, p. 121-126.

VICH-FDA, 2015. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products – Food and Drug Administration. Guidance for Industry – Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies. VICH GL49(R). 2015

WHYTE, S.K.; WESTCOTT, J.D; BYRNE, P; HAMMELL, K.L. Comparison of the depletion of emamectin benzoate (SLICE®) residues from skeletal muscle and skin of Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) for multiple dietary dose regimens at 10°C. *Aquaculture* 315 (2011) 228-235.

7. ANEXO

7.1 Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

UNESP
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Estudo de depleção residual de benzoato de emamectina em filês de tilápia e estimativa de período de carência"**, protocolo nº 019032/17, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Fabiana Pilarski, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 07 de dezembro de 2017.

Vigência do Projeto	01/01/2018 a 30/04/2018
Espécie / Linhagem	Oreochromis niloticus
Nº de animais	120
Peso / Idade	500g
Sexo	-
Origem	Piscicultura

Jaboticabal, 07 de dezembro de 2017.

Prof. Dr. Eterton Cid Rigobelo
Vice Coordenador – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
tel 16 3209 2600 fax 3202 4275 - www.fcav.unesp.br