UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Albendazol na piscicultura: estudo de incorporação do fármaco
na ração e estimativa do período de carência para a espécie de
peixe pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**

Zenaís Busatto

**Ribeirão Preto
2016**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Albendazol na piscicultura: estudo de incorporação do fármaco na ração e estimativa do período de carência para a espécie de peixe pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado (a): Zenaís Busatto

Orientador (a): Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 28/11/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

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.

Busatto, Zenaís

Albendazol na piscicultura: estudo de incorporação do fármaco na ração e estimativa do período de carência para a espécie de peixe pacu (*Piaractus mesopotamicus*).
Ribeirão Preto, 2016.

95 p.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Paschoal, Jonas Augusto Rizzato.

1. Antiparasitários 2. Albendazol. 3. Aquicultura. 4. Período de carência 5. Lixiviação 6. LC-MS/MS. 7. QuEChERS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Zenaís Busatto

Título do trabalho: Albendazol na piscicultura: estudo de incorporação do fármaco na ração e estimativa do período de carência para a espécie de peixe pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientador (a): Prof. Dr. Jonas Augusto
Rizzato Paschoal

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pelo amor incondicional, pela vida, pela minha família e pelas oportunidades que tem me proporcionado.

Aos meus pais, **Luiz e Zenaide**, por terem lutado para que eu pudesse estudar, por sempre estarem presentes na minha vida, por terem me apoiado na minha escolha profissional, por terem me ajudado e me orientado em todos os momentos.

Ao meu irmão, **Ítalo**, por estar sempre comigo e por ter me ajudado inúmeras vezes.

Ao **Lucas** pelo amor, apoio e compreensão. Obrigado por estar comigo nos momentos perfeitos e nas horas difíceis. Você é muito importante para mim.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jonas A. R. Paschoal**, pelo aceite em me orientar, pelo apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho, pela paciência, pelo incentivo e por contribuir de maneira imensurável na minha formação acadêmica. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Oswaldo de Freitas** pelo auxílio no desenvolvimento da razão.

Aos amigos de laboratório, **Marina, Rodolfo, Ana Paula, Juliana, Pedro, Carol** pelos bons momentos, ajuda, troca de experiências, discussões e conhecimentos.

Aos colegas funcionários do laboratório, **Roberto e Agnaldo** pela amizade e suporte para a execução deste projeto.

Aos meus queridos amigos, **Erika, Cristina, Victor, Rayssa, Robson, Luciana, Gabriel, Lydiane, Franco** pelos momentos de descontração e alegria, pelos conselhos. Vou levar vocês sempre comigo.

As minhas primas, **Miriam e Dionara**, pelos conselhos, amizade e por estarem sempre presentes na minha vida.

À **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”** e ao **Prof. José Eurico Possebon Cyrino** pela disponibilidade do local para a condução dos experimentos com os peixes.

Ao **Welliton França**, pelo auxílio na condução do experimento com os peixes.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Física e Química e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas** pela possibilidade de desenvolver este projeto.

Aos **funcionários da Secretaria de Pós-graduação**. Obrigada por toda ajuda prestada.

À **empresa Colorcon** (São Paulo, Brasil) pelo polímero fornecido que tornou possível o desenvolvimento da ração.

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 a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro através do projeto 2012/18334-0.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

BUSATTO, Z. **Albendazol na piscicultura: estudo de incorporação do fármaco na ração e estimativa do período de carência para a espécie de peixe pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O albendazol (ABZ) é um antiparasitário amplamente utilizado na medicina veterinária para tratar infecções causadas por parasitas helmínticos, devido ao seu baixo custo de aquisição, alta eficácia e facilidade de administração. Apesar, de sua eficácia ser mundialmente conhecida, seu uso não é regulamentado em espécies aquícolas. Diante da demanda nacional por uma maior variedade de medicamentos veterinários regulamentados para uso na aquicultura, o presente projeto visou estimar o período de carência para o ABZ. Para tanto, foi necessário: (i) incorporar o ABZ na ração através da técnica de revestimento polimérico em equipamento de leito fluidizado; (ii) desenvolver e avaliar os métodos analíticos para a determinação do ABZ na ração e do ABZ e seus metabólitos em filé de pacu empregando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) e (iii) realizar um ensaio com pacu para avaliar a depleção do ABZ e seus metabólitos no filé desses peixes. O revestimento da ração com 1,5% de etilcelulose permitiu incorporar o ABZ na ração sem alterar a estrutura física da mesma, o que torna o processo vantajoso, visto que, a ração mantém suas características de fluviabilidade. Além disso, o processo foi homogêneo e diminuiu a lixiviação do fármaco para a água, garantindo a segurança da dose administrada e do meio ambiente. O ABZ foi isolado da ração por extração líquido-líquido. O ABZ e seus metabólitos foram extraídos do filé de pacu pelo método de QuEChERS modificado. Para os dois métodos desenvolvidos, a separação cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa octadecil híbrida. Os métodos foram avaliados mediante os seguintes parâmetros: seletividade, curva analítica, linearidade, precisão e exatidão. Para o método do filé de peixe avaliou-se também o CC α e o CC β . Todos os parâmetros avaliados se encontram de acordo com os guias de validação, o que torna os métodos adequados para os objetivos propostos no presente trabalho. Para avaliar a depleção do ABZ e seus metabólitos no filé de pacu, os peixes receberam o fármaco via ração em dose única de 10 mg de ABZ (kg peso vivo)⁻¹. As curvas de depleção residual do ABZ e seus metabólitos se ajustaram ao modelo exponencial de primeira ordem. Tomando como referência as recomendações da EMA, o período de carência foi estimado em sete dias.

Palavras-chave: antiparasitários, albendazol, aquicultura, período de carência, lixiviação, LC-MS/MS, QuEChERS

ABSTRACT

BUSATTO, Z. **Albendazole in pisciculture: study for drug incorporation in fish feed and estimation of the withdrawal time for the species of pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Albendazole (ABZ) is an antiparasitic widely used in veterinary medicine to treat infections caused by parasites anthelmintic, due to its low cost, high efficiency and ease of administration. Regardless of its world widely known effectiveness, its use is not regulated in aquaculture species. Faced with national demand for a greater variety of regulated veterinary drugs for use in aquaculture, this project aimed to estimate the withdrawal time for the ABZ. Therefore, it was necessary to (i) incorporate ABZ the feed through the polymeric coating by spouted bed technique; (ii) develop and evaluate analytical methods for determining the ABZ in feed and ABZ and its metabolites in pacu fillet using high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS / MS) and (iii) conduct a test with pacu to evaluate the depletion of ABZ and its metabolites in the fillet of these fish. The ration with 1.5% coating of ethylcellulose allowed incorporate ABZ the feed without altering the physical structure of the same, which makes the process advantageous, since the feed maintains its buoyancy characteristics. Furthermore, the process was homogeneous and reduced leaching of the drug into the water, ensuring the safety of the administered dose and the environment. The ABZ ration was isolated by liquid-liquid extraction. The ABZ and its metabolites were extracted from pacu fillet the modified QuEChERS method. For both developed methods, chromatographic separation was performed in a hybrid octadecyl reverse phase column. The methods were evaluated by the following parameters: selectivity, analytical curve, linearity, precision and accuracy. For fish fillet method also assessed whether it CC α and CC β . All parameters are according to the validation guides, which makes the appropriate methods for the objectives proposed in this paper. To evaluate the depletion of ABZ and its metabolites in pacu fillet, the fish were dosed via single dose in feed 10 mg ABZ (kg body weight)⁻¹. The curves of residual depletion ABZ and its metabolites adjusted to the exponential model of the first order. With reference to the recommendations of the EMA, the withdrawal time was estimated at seven days.

Keywords: antiparasitic drugs, albendazole, aquaculture, withdrawal time, leaching, LC-MS/MS, QuEChERS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Metabolismo do ABZ.....	22
Figura 2	–	Representação esquemática do procedimento de extração do ABZ da ração.....	39
Figura 3	–	Representação esquemática do procedimento de extração do ABZ e seus metabólitos no filé de pacu.....	44
Figura 4	–	Tanques utilizados para a realização do ensaio com os pacus.....	47
Figura 5	–	Fotografias da sequência de procedimentos realizados para a coleta dos filés dos peixes.....	48
Figura 6	–	Cromatograma característico da separação do ABZ e FNC (todos a 800 ug g ⁻¹) da amostra branco de ração fortificada com esses analitos.....	50
Figura 7	–	Estrutura química do ABZ e da FNC.....	51
Figura 8	–	Cromatogramas característicos para (A) amostra branco de ração, (B) amostra branco fortificada com ABZ e (C) amostra branco fortificada com FNC (todas a 800 µg g ⁻¹).....	53
Figura 9	–	Curva analítica para a determinação de ABZ na ração e o respectivo gráfico de resíduos.....	54
Figura 10	–	Cromatogramas característicos da amostra branco de filé de pacu fortificada com ABZ, ABZSO, ABZSO ₂ , ABZ-2-NH ₂ SO ₂ e FNC (PI) na concentração de 100 ng g ⁻¹ , após procedimento de extração.....	59
Figura 11	–	Cromatogramas característicos para (A) amostras branco de filé de pacu, (B) amostra branco fortificada com ABZ, (C) amostra branco fortificada com ABZSO, (D) amostra branco fortificada	

com ABZSO ₂ , (E) amostra branco fortificada com ABZ-2-NH ₂ SO ₂ e (F) amostra branco fortificada com FNC (PI).....	63
Figura 12 – Curvas analíticas e gráficos de resíduos para o ABZ, ABZSO, ABZSO ₂ e ABZ-2-NH ₂ SO ₂ obtidas para o método desenvolvido para a quantificação dessas substâncias por LC- MS/MS.....	64
Figura 13 – Gráficos das curvas de depleção residual para os diferentes marcadores residuais a partir dos modelos matemáticos de ajustes não lineares adotados.....	69
Figura 14 – Gráfico da curva de depleção residual para a soma de todos os marcadores residuais do uso de ABZ a partir do modelo matemático quadrático de ajuste adotado.....	71
Figura 15 – Gráficos das retas de depleção residual para os diferentes marcadores residuais a partir das respectivas regressões.....	72
Figura 16 – Gráfico da reta de depleção residual considerando a soma de todos os diferentes marcadores residuais a partir da regressão linear.....	73
Figura 17 – Gráficos de distribuição normal dos erros do ajuste das regressões lineares.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Medicamentos veterinários aprovados para uso na aquicultura.....	20
Tabela 2 – Valores de LMR estabelecidos para o ABZ.....	24
Tabela 3 – Composição da ração comercial utilizada no estudo.....	36
Tabela 4 – Gradiente utilizado no método cromatográfico desenvolvido para determinação do ABZ e seus metabólitos no filé de pacu.....	42
Tabela 5 – Transições monitoradas para o ABZ e seus metabólitos.....	42
Tabela 6 – Parâmetros físico-químicos da água das caixas durante o ensaio com os peixes.....	47
Tabela 7 – Parâmetros de avaliação analítica do método de determinação de ABZ na ração.....	55
Tabela 8 – Análise da ração preparada com ABZ.....	57
Tabela 9 – Porcentagem de perda de ABZ em função do tempo.....	58
Tabela 10 – Critérios de aceitação da precisão.....	65
Tabela 11 – Parâmetros de avaliação analítica do método de determinação do ABZ e seus metabólitos no filé de pacu.....	66
Tabela 12 – Parâmetros do ajuste do modelo matemático não linear para as curvas de depleção residual conforme os marcadores monitorados.....	68
Tabela 13 – Parâmetros do ajuste do modelo matemático não linear para a curva de depleção residual da soma de todos os marcadores residuais.....	70
Tabela 14 – Parâmetros do ajuste das regressões lineares das curvas de depleção residual conforme os marcadores monitorados.....	73

Tabela 15 – Parâmetros do ajuste da regressão linear para a curva de depleção residual da soma de todos os marcadores residuais.....	74
Tabela 16 – Teste de Bartlett para avaliação da homogeneidade das variâncias.....	74
Tabela 17 – Avaliação do ajuste da linearidade das regressões dos diferentes marcadores residuais.....	75
Tabela 18 – Teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos erros de ajuste.....	76
Tabela 19 – Períodos de carência estimados para os diferentes marcadores residuais monitorados nos estudos de depleção em filé de pacu.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABZ	Albendazol
ABZSO	Albendazol sulfóxido
ABZSO ₂	Albendazol sulfona
ABZ-2-NH ₂ SO ₂	Albendazol -2- aminosulfona
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Trifosfato de Adenosina
CCAB	Comitê do Codex Alimentarius do Brasil
CC _α	Limite de Decisão
CC _β	Capacidade de Detecção
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFR	Código de Regulamento Federal
CONMETRO	Conselho Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
ESI	Ionização por Eletronebulização
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação
FDA	Agência Americana de Drogas e Alimentos
FNC	Fenacetina
LC–MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
LMR	Limite Máximo de Resíduos

LMPR	Limite Mínimo de Performance Requerida
MAPA	Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento
MAE	Extração Assistida por Microondas
MeOH	Metanol
MEPS	Micro Extração Empacotada por Sorbentes
MSPD	Dispersão da Matriz em Fase Sólida
OMC	Organização Mundial do Comércio
PAMVET	Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos
PC	Período de Carência
PCB	Bifenilas Policloradas
PI	Padrão Interno
PLE	Extração Líquida Pressurizada
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PVK-30	Polivinilpirrolidona
PSA	Amina Primária e Secundária
SBSE	Extração Sortida em Barras de Agitação
SFE	Extração com Fluido Supercrítico
SPE	Extração em Fase Sólida
SPME	Microextração em Fase Sólida
SRM	Monitoramento das Reações Seleccionadas
QuEChERS	Rápido, Fácil, Efetivo, Robusto, Seguro
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Aquicultura	17
1.2. Uso de medicamentos veterinários na aquicultura.....	18
1.2.1. Albendazol.....	21
1.3. Segurança toxicológica alimentar	22
1.4. Legislação e inspeção nacional.....	24
1.5. Métodos e técnicas de preparação de amostras para o monitoramento de resíduos em alimentos	26
1.5.1. Método QuEChERS	27
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Materiais.....	33
3.1.1. Equipamentos e acessórios	33
3.1.2. Reagentes e solventes	34
3.1.3. Preparo de soluções.....	34
3.1.3.1. Soluções – padrão.....	34
3.1.3.2. Soluções de trabalho.....	35
3.1.4. Ração comercial.....	35
3.1.5. Amostra branco de filé.....	36
3.2. Métodos.....	36
3.2.1. Incorporação do albendazol na ração	36
3.2.2. Ensaio de lixiviação	37
3.2.3. Determinação do albendazol na ração	38
3.2.3.1. Método analítico empregando LC-MS/MS.....	38
3.2.3.2. Extração do albendazol da ração	38
3.2.3.3. Avaliação analítica do método desenvolvido	40
3.2.4. Determinação do albendazol e seus metabólitos no filé de peixe	41
3.2.4.1. Método analítico empregando LC-MS/MS.....	41
3.2.4.2. Extração do albendazol e seus metabólitos do filé de peixe	43
3.2.4.3. Avaliação analítica do método desenvolvido	44

3.2.5. Ensaio de depleção residual do albendazol e seus metabólitos em filé de pacu	46
3.2.5.1. Condições experimentais	46
3.2.5.2. Estudo de depleção.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
4.1. Determinação de albendazol na ração	50
4.1.1. Método analítico empregando LC-MS/MS.....	50
4.1.2. Extração do albendazol da ração	51
4.1.3. Avaliação analítica do método para a ração.....	52
4.1.3.1. Seletividade.....	52
4.1.3.2. Curva analítica, linearidade	53
4.1.3.3. Precisão	54
4.1.3.4. Exatidão	54
4.1.4. Avaliação do processo de incorporação do albendazol na ração.....	55
4.2. Ensaio de lixiviação	57
4.3. Determinação do albendazol e seus metabólicos no filé de peixe	58
4.3.1. Método analítico empregando LC-MS/MS.....	58
4.3.2. Extração do albendazol e seus metabólitos do filé de peixe	59
4.3.3. Avaliação analítica do método para o filé de pacu	62
4.3.3.1. Seletividade.....	62
4.3.3.2. Curva analítica, linearidade	62
4.3.3.3. Precisão	65
4.3.3.4. Exatidão	65
4.3.3.5. Limite de Decisão (CC α) e Capacidade de Detecção (CC β).....	66
4.4. Ensaio de depleção residual	67
4.4.1. Análise das amostras provenientes do ensaio de depleção.....	67
4.4.2. Avaliação dos resultados de depleção do albendazol e seus metabólitos em filé de pacu	68
5. CONCLUSÕES	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
7. ANEXO.....	95
7.1. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	95

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aquicultura

A aquicultura, que compreende todas as formas de produção de animais e/ou plantas aquáticas em ambientes de água doce, salobra e marinha, é atualmente, o setor de produção de alimentos de origem animal com a maior taxa de crescimento em todo o mundo (DEFOIRDT; SORGELOOS; BOSSIER, 2011; FEUCHT & ZANDER, 2015).

O setor aquícola tem alcançado um rápido crescimento devido ao aumento significativo na demanda por produtos alimentícios em todo o mundo (TYAPKOVA et al., 2016; TIDWELL; ALLAN, 2001). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* – FAO), nas últimas cinco décadas, o consumo de peixes no mundo ultrapassou o crescimento da população mundial (FAO, 2014).

Atualmente, a aquicultura desempenha um papel importante nos esforços globais para eliminar a fome e a desnutrição através do fornecimento de peixes e outros produtos aquáticos ricos em proteínas, ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais (SUBASINGHE; SOTO; JIA, 2009; REVERTER et al., 2014).

No que diz respeito ao papel da aquicultura no desenvolvimento de um país, essa atividade pode proporcionar oportunidades de emprego e contribuir para a melhoria da renda da população (SUBASINGHE; SOTO; JIA, 2009; BÉNÉ et al., 2016). A FAO (2014) estima que a pesca e a aquicultura sejam responsáveis pela subsistência de 10 a 12 por cento da população mundial. Dessa forma, o desenvolvimento desse setor é extremamente importante para países emergentes.

A aquicultura mundial é fortemente dominada pela região Ásia-Pacífico (JIANG et al., 2013). Contudo, alguns países emergentes tornam-se cada vez mais importantes no comércio de peixes e produtos da pesca. Brasil, México, Federação Russa e Egito têm aumentado sua participação no comércio de produtos pesqueiros. Esses países emergentes, cujas exportações representavam apenas 34% do comércio mundial em 1982, viram sua cota aumentar para 54% do valor total das exportações da pesca em 2012. No mesmo ano, as suas exportações

representavam mais de 60% da quantidade total de exportações de produtos da pesca (FAO, 2014).

O Brasil possui alto potencial para atender à crescente demanda mundial por produtos de origem pesqueira, sobretudo por meio da aquicultura. É um dos poucos países que apresenta disponibilidade de recursos hídricos, condições geográficas e climáticas favoráveis que permitem a produção tanto de espécies exóticas, como a tilápia, e nativas, como o pacu (CREPALDI et al., 2007; OLIVEIRA, 2009). Ademais, por ser um país de expressiva produção agrícola, apresenta uma grande disponibilidade de produtos e subprodutos que podem ser utilizados na formulação de rações a um custo relativamente baixo.

Com a estagnação da pesca extrativa, a aquicultura brasileira vive um momento de expansão e transformação (SEBRAE, 2015). Essa atividade tem promovido o desenvolvimento econômico em várias regiões, gerando renda, empregos e o aumento do fornecimento do pescado para o mercado nacional e internacional. A meta do governo brasileiro é incentivar a produção nacional para que, em 2030, o país alcance a expectativa da FAO e se torne um dos maiores produtores do mundo, com 20 milhões de toneladas de pescado por ano.

A FAO (2014) destaca que o Brasil possui um grande mercado interno e competência instalada nas suas indústrias de processamento e conservação do pescado em condições de competir com qualquer país do mundo.

1.2. Uso de medicamentos veterinários na aquicultura

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 no ambiente aquático, como uma queda acentuada da temperatura, por exemplo, além de práticas de manejo inadequadas, também afetam diretamente o estado de saúde dos peixes, deixando a população mais vulnerável aos surtos de doenças infecciosas (PAVANELLI et al., 2002; ROTTA; QUEIROZ, 2003).

A abordagem mais eficaz para reduzir o surgimento de doenças infecciosas na aquicultura é evitar a introdução de agentes patogênicos causadores de doenças. Nesse contexto, as boas práticas de manejo aquícola são essenciais para manter um ambiente saudável e assegurar o bem-estar animal (BOISON; TURNIPSEED, 2015).

Quando ocorre o surgimento de doenças no ambiente aquático, medicamentos veterinários, tais como antibióticos, antifúngicos, antiparasitários e outros parasiticidas são utilizados para controlar o impacto e evitar a perda total ou parcial dos animais (CARRASCHI et al., 2014; LOPES et al., 2012; RICO; VAN DEN BRINK, 2014).

Até o presente, existem poucos fármacos regulamentados no Brasil para serem administrados a espécies aquícolas no combate a doenças infecciosas, que são os antimicrobianos florfenicol e a oxitetraciclina, duas formulações homeopáticas e um antiparasitário a base de triclorfon, além de uma vacina utilizada contra infecções estreptocócicas. Outros fármacos disponíveis constituem-se em produtos utilizados na desinfecção das instalações ou na conservação de matérias-primas e rações, empregadas nas alimentações de espécies aquícolas (SINDAN, 2016). Alguns desses medicamentos veterinários são listados na Tabela 1.

Devido à carência de alternativas de medicamentos veterinários regulamentados para uso na aquicultura nacional e ao alto custo dos medicamentos disponíveis, há suspeita de que os 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 (LU et al., 2016; BAÑUELOS et al., 2016; FALLAH; BARANI, 2014).

Diante do exposto verifica-se um cenário de grande demanda por novas alternativas terapêuticas que sejam efetivas contra as principais moléstias que afetam as espécies aquícolas de interesse comercial para o Brasil e que possam a vir a ser regulamentados para uso veterinário nesse setor.

Neste contexto, destacamos o albendazol (ABZ), um reconhecido antiparasitário pertencente à classe dos benzimidazóis, como um potencial fármaco para uso na aquicultura.

Tabela 1 – Medicamentos veterinários aprovados para uso na aquicultura brasileira.

Nome comercial	Princípio ativo	Espécie	Indicação	Período de carência
Aquaflor 50% Premix	Florfenicol	Tilápia e seus híbridos; truta arco-íris	Tilápia: Septicemias hemorrágicas causadas por <i>Aeromonas</i> spp. Estreptococose ocasionada por <i>Streptococcus agalactie</i> . Truta arco-íris: Doença da boca vermelha ocasionada por <i>Yersinia ruckeri</i>	Tilápia: 14 dias Truta arco-íris: É calculado de acordo com a temperatura média da água, seguindo a fórmula: $135/\text{Temperatura } (^{\circ}\text{C})$
Aquavac® strep (vacina)	Células bacterianas de <i>Streptococcus agalactie</i>	Tilápia	Imunização ativa de tilápias para reduzir a mortalidade e a doença decorrente de estreptococose causada por <i>Streptococcus agalactie</i>	Não especificado
TM-700	Oxitetraciclina	Bagre	Septicemia hemorrágica causada por <i>Aeromonas liquefaciens</i> . Doenças ocasionadas por pseudomonas	21 dias
Fator endecto aquicultura	Complexo homeopático	Crustáceos, moluscos, rãs, camarões, jacaré e peixes	Controle de endo e ectoparasitos em organismos aquáticos	Não especificado
Fator infecções aquicultura	Complexo homeopático	Peixes	Controle de doenças infecto-contagiosas causadas por bactérias, vírus e fungos	Não especificado
Masoten	Triclorfone	Truta, carpa, enguia e outros	Combate alguns parasitas de água doce tais como <i>Argulus</i> sp., <i>Ergasilus</i> sp., <i>Lemnea</i> sp., <i>Trichodinas</i> , <i>Dactylogyrus</i> sp., <i>Gyrodactylus</i> sp. e diversos trematódeos	Não especificado

1.2.1. Albendazol

Ao entrar em contato com o peixe, os parasitas afetam o comportamento e a saúde do animal, causando perdas econômicas significativas. Além disso, o consumo de peixes crus ou mal cozidos pode contribuir para que o ser humano ingira parasitas patogênicos, o que representa um problema de saúde pública (LIMA dos SANTOS; HOWGATE, 2011). Tendo isso em vista, verifica-se a importância da disponibilidade de fármacos veterinários de ação antiparasitária regulamentados para uso em espécies aquícolas.

O ABZ é um anti-helmíntico polivalente, que exerce atividade vermicida, ovicida e larvicida sobre os cestódeos, nematódeos e acantocéfalos. Age por contato direto com os vermes, inibindo a formação de seus microtúbulos através do bloqueio da captação da glicose. Isto resulta na depleção de glicogênio dos parasitos e, por sua vez, na formação reduzida de trifosfato de adenosina (ATP) necessário para a sobrevivência e reprodução destes. Consequentemente ocorrem paralisia e morte dos vermes, que são eliminados do organismo (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2009; SPINOSA et al., 2011).

O ABZ é extensivamente metabolizado, após administração oral, em seu metabólito farmacologicamente ativo, o albendazol sulfóxido (ABZSO) (RATHOD et al., 2016; ZHANG et al., 2011). Vale ressaltar que tanto o ABZ como o ABZSO possuem atividade farmacológica (MULIA-YÉPEZ et al., 1999). O ABZSO é oxidado em albendazol sulfona (ABZSO₂). O grupo carbamato também é rapidamente desacetilado, levando à formação do albendazol-2-aminosulfona (ABZ-2-NH₂SO₂). Este último metabólito é minoritário e, assim como o ABZSO₂, não apresenta atividade farmacológica (BATISTÃO, 2013; CHIAP et al., 2000; HORVAT, 2012). As estruturas químicas do ABZ e dos seus metabólitos são apresentadas na Figura 1.

Quando o ABZ é administrado a animais produtores de alimentos, os vários metabólitos, além do composto de origem, podem ser encontrados nos tecidos animais (DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2007).

O ABZ é rotineiramente empregado na medicina humana e veterinária para tratar doenças helmínticas devido ao seu amplo espectro de atividade, baixo custo, alta eficácia e facilidade de administração (DAYAN, 2003; BELAZ, 2007; WU et al., 2005).

Figura 1 – Estruturas químicas do ABZ e dos seus metabólitos.

Atualmente, o ABZ é listado no Código de Regulamentos Federal (*Code of Federal Regulations* – CFR) e aprovado para uso em bovinos, ovinos e caprinos. Devido à alta eficácia e baixa toxicidade, o ABZ tem sido utilizado para tratar diversos parasitas que acometem os peixes, tais como microsporídeos (SCHMAHAL; BENINI, 1998; SPEARE et al., 1999), infestações por tênia *Eubothrium crassum* (YU et al., 2011) e infecções ocasionadas pelo flagelado *Hexamita salmonis* (TOJO; SANTAMARINA, 1998). Além disso, estudos de depleção residual do ABZ e seus metabólitos têm sido realizados para algumas espécies de peixes como truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*), salmão do Atlântico (*Salmo salar*), tilápia (*Oreochromis nilótica* x *O. mosambicus*), bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), achigã (*Micropterus salmoides*), robalo riscado híbrido (*Morone chrysops* x *saxatilis*) (SHAIKH et al., 2003, 2006, 2009) e perca amarela (*Perca flavescens*) (YU et al, 2011), evidenciando seu potencial de exploração veterinária como antiparasitário para a aquicultura.

1.3. Segurança toxicológica alimentar

O uso de medicamentos veterinários é um recurso útil, muitas vezes necessário no setor produtivo, e que quando recorrido, o risco decorrente da presença de resíduos dessas substâncias no alimento de origem animal deve ser levado em consideração (KANG et al., 2014).

A presença de resíduos em tecidos animais destinados ao consumo humano em concentrações acima daquelas consideradas toxicologicamente seguras, pode causar efeitos adversos à saúde do consumidor. Alergias, desenvolvimento de resistência nos agentes patogênicos aos fármacos e mudança nos padrões de colonização da flora intestinal, são alguns dos riscos potenciais observados nos seres humanos que entram em contato, através da cadeia alimentar, com os resíduos de fármacos de uso veterinário através da dieta. Sendo assim, o monitoramento do uso de tais substâncias na criação de animais é muito importante e visa, principalmente, a proteção do consumidor (LOPES et al., 2012; PERICÁS et al., 2011; SANTOS; RAMOS, 2016).

Alguns órgãos importantes como o *Codex Alimentarius*, Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency – EMA*) e Agência de Saúde do Canadá (*Health Canada*) têm estabelecido Limites Máximos de Resíduos (LMR) para uma grande variedade de fármacos veterinários em diversos tecidos animais (PIATKOWSKA; JEDZINIAK; ZMUDZKI, 2014).

Para medicamentos de uso veterinário, o LMR é definido como a concentração máxima aceitável de uma substância nos produtos comestíveis de um animal (gordura, rins, fígado, músculos, mel, leite e ovos) que, sendo ingerida pelo ser humano, não representa risco para sua saúde (WHO, 2009).

A Tabela 2 lista os resíduos marcadores e os valores de LMR estabelecidos para o ABZ – fármaco de interesse no presente trabalho – na matriz muscular de diferentes espécies animais. Nota-se que não há uma harmonização entre a escolha do resíduo marcador e os valores de LMR estabelecidos e divulgados pelas organizações.

No caso de substâncias de uso proibido em animais de produção de alimentos, para as quais não há um LMR estabelecido, a Comunidade Europeia (Diretiva 2002/657/EC) propõe o estabelecimento de um Limite Mínimo de Performance Requerida (LMPR), o qual representa a mínima quantidade da substância na amostra que deve ser detectada e confirmada por um determinado método analítico (EC, 2002).

Tabela 2 – Valores de LMR estabelecidos para o ABZ.

Organização	Resíduo marcador	Espécie	LMR (ng g ⁻¹)
<i>Codex Alimentarius</i>	ABZ-2-NH ₂ SO ₂	não específica	100
EMA	soma do ABZSO, ABZSO ₂ e ABZ-2-NH ₂ SO ₂ expressos como ABZ	Todos os ruminantes	100
<i>Health Canada</i>	ABZ-2-NH ₂ SO ₂	Bovinos	50
MAPA	não específica	Bovinos e suínos	100

O *Codex Alimentarius* é um Programa Conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação e da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* – WHO). Trata-se de um fórum internacional de normatização do comércio de alimentos, criado em 1963, com sede em Roma, e suas normas têm como finalidade proteger a saúde dos consumidores e assegurar práticas justas no comércio internacional de alimentos (VARADI, 2007; MAPA, 2016; SOMOGYI et al., 2011). Na década de 70, o Brasil tornou-se membro deste Programa e, em 1980, com a criação do Comitê do *Codex Alimentarius* do Brasil (CCAB), através das Resoluções 01/80 e 07/88 do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (CONMETRO), conseguiu uma articulação mais representativa do setor alimentício internacional. O CCAB tem como principais finalidades a participação nos Comitês internacionais do *Codex Alimentarius* e a defesa dos interesses nacionais, bem como a utilização das Normas do *Codex* como referência para a elaboração, atualização da legislação e regulamentação nacional de alimentos (INMETRO, 2016).

Os regulamentos oficiais não só autorizam os tipos de medicamentos que podem ser utilizados, como também especificam a espécie alvo, o diagnóstico, a dose do medicamento, a duração do tratamento e o período de carência (BOISON; TURNIPSEED, 2015).

1.4. Legislação e inspeção nacional

No Brasil, em 1986, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC, instituído pela Portaria Ministerial nº 51, de 06/02/1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº 527, de 15/08/1995. Este plano previa a adoção de programas setoriais de controle de remanescentes residuais em carne, leite, mel e pescado, em decorrência do uso de agrotóxicos e medicamentos veterinários, ou por acidentes envolvendo contaminantes ambientais. A instrução Normativa nº 14, de 25/05/2009, estendeu o escopo de medicamentos antiparasitários (inclusão do albendazol) investigados pelo PNCRC para a carne (bovina e suína) e o leite. No entanto, até a atualização das atividades do PNCRC descritas pela Instrução Normativa nº 13, de 15/07/2015, o programa ainda não incluiu a determinação de albendazol e seus metabólitos em pescado – substâncias alvo do presente trabalho. As substâncias alvo do programa até o momento são: contaminantes inorgânicos, antimicrobianos, substâncias com ação anabolizante, corantes, organoclorados, dioxinas, furanos e bifenilas policloradas (*Polychlorinated biphenyls* – PCB).

Um dos principais objetivos do PNCRC é integrar o esforço destinado à melhoria da produtividade e da qualidade dos alimentos de origem animal colocado à disposição da população brasileira, e secundariamente, proporcionar ao país, condições de se adequar do ponto de vista sanitário, às regras do comércio internacional de alimentos, preconizadas pela Organização Mundial do Comércio (OMC) e outros órgãos como a FAO e a WHO.

Também atento à importância da questão da presença de resíduos de contaminantes em alimentos para a saúde pública, o Ministério da Saúde (MS), representado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou em 2003, o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo - PAMVet - (Resolução RDC nº 253 de 16/09/2003). Este programa visa avaliar o potencial de exposição do consumidor aos resíduos de medicamentos veterinários pela ingestão de alimentos de origem animal adquiridos no comércio. Entre os alimentos selecionados, está priorizado o leite bovino, porém outras matrizes como carnes (frango, bovina e suína), pescado, ovo e mel, estão previstas para fazer parte do escopo monitorado.

1.5. Métodos e técnicas de preparação de amostras para o monitoramento de resíduos em alimentos

O controle de qualidade dos alimentos de origem animal quanto à presença de resíduos de medicamentos veterinários é imprescindível na questão da segurança toxicológica alimentar. Para tanto, faz-se necessário o desenvolvimento e avaliação de métodos analíticos com sensibilidade e seletividade adequadas para identificar e quantificar eventuais resíduos dessas substâncias que possam estar presentes em tecidos animais destinados ao consumo humano.

Considerando a complexidade de matrizes alimentares, como a carne de peixe, e os baixos níveis dos constituintes de interesse, o tratamento da amostra torna-se um passo crucial no procedimento analítico.

O preparo da amostra pode ser descrito como um processo de extração de resíduos químicos a partir da amostra, e a subsequente purificação do extrato a fim de isolar os analitos de interesse e remover quaisquer interferentes da matriz que poderiam afetar o desempenho da técnica analítica empregada (KLIMEK-TUREK et al., 2016; KINSELLA, et al., 2009).

Abordagens recentes sobre o preparo de amostra e/ou extração de resíduos e contaminantes nos alimentos apresentam diferentes métodos e técnicas tais como Extração com Fluido Supercrítico (SFE), Extração Líquida Pressurizada (PLE), Extração Assistida por Microondas (MAE), Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD), Extração em Fase Sólida (SPE), Microextração em Fase Sólida (SPME), Extração Sortiva em Barras de Agitação (SBSE) e QuEChERS (Quick, Easy, Effective, Rugged, Safe), cuja tradução significa rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro (BULDINI; RICCI; SHARMA, 2002; ZHANG et al., 2012; LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007).

Devido a sua versatilidade, o método de QuEChERS têm sido amplamente empregado para a extração de diferentes grupos de compostos em diferentes matrizes (ambientais, alimentares e biológicas) e será melhor discutido a seguir (CHOI et al., 2015; DMITRIENKO et al., 2014).

1.5.1. Método QuEChERS

Em 2003, Anastassiades e colaboradores propuseram um novo método de preparo de amostra para a análise de resíduos de praguicidas em frutas e vegetais com o intuito de superar as limitações práticas dos principais métodos de extração empregados na época. Durante o desenvolvimento desse método, que foi denominado QuEChERS, os seguintes parâmetros foram avaliados: quantidade de amostra, natureza do solvente extrator, forma de agitação, efeito da adição de sais para promover a partição líquido-líquido e facilitar a separação de fases e tipo de sorvente empregado na extração em fase sólida dispersiva.

O procedimento de preparo foi otimizado para 10 g de amostra e envolve três etapas principais: (1) extração dos analitos com acetonitrila (ACN); (2) partição promovida pela adição de sais, como por exemplo, sulfato de magnésio (MgSO_4) e cloreto de sódio (NaCl); e (3) limpeza do extrato empregando a técnica denominada Extração em Fase Sólida Dispersiva (*dispersive Solid Phase Extraction* — d-SPE) (LOPES et al., 2012; DULAURENT et al., 2016).

A seleção de um tamanho mínimo de amostra que seja representativa do todo é essencial para assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos (HERCEGOVÁ; DÖMÖTÖROVÁ; MATISOVÁ, 2007). Do mesmo modo, as amostras devem ser trituradas exaustivamente para maximizar a área de superfície de contato e garantir uma melhor eficiência de extração durante a agitação. Tomando como base as evidências da literatura e as experiências anteriores, os autores definiram o tamanho da amostra em 10 g. Contudo, ressaltam que diferentes quantidades de amostra podem ser utilizadas desde que o método seja redimensionado de forma adequada (ANASTASSIADES et al., 2003).

A escolha do solvente de extração é uma decisão crucial no desenvolvimento de um método. Os solventes frequentemente utilizados são ACN, acetona, MeOH, etanol e acetato de etila. Dentre esses, a ACN se destaca pela sua seletividade, ou seja, possibilita a extração de uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos (REJCZAK; TUZIMSKI, 2015). Ademais, a ACN promove a extração de uma ampla faixa de analitos com diferentes polaridades e, quando acidificada, proporciona recuperações satisfatórias de analitos que geralmente apresentam

problemas de estabilidade. Outra vantagem é que a ACN apresenta polaridade intermediária e baixa viscosidade, tornando seu uso mais adequado quando o método está associado ao emprego de técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (LEHOTAY; MASTOVSKÁ; YUN, 2005; GONZÁLES-CURBELO et al., 2015). Dessa forma, a ACN foi escolhida como o solvente de extração para o método QuEChERS. Em relação à razão solvente/amostra, a proporção 1:1 (v/m) mostrou ser suficiente e adequada para conseguir uma extração quantitativa.

A etapa de partição, através da adição de sais (por exemplo, NaCl), promove o efeito “*salting out*”. Quando a ACN é utilizada como solvente extrator obtém-se melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (RODRIGUES et al., 2011; PRESTES et al., 2009).

A adição de sais é uma etapa muito conveniente uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona melhor separação entre as fases orgânica e aquosa (PRESTES et al., 2009).

A utilização de sais secantes, como sulfato de sódio (Na_2SO_4), tem a finalidade de melhorar a recuperação de compostos polares. A escolha do sulfato de magnésio (MgSO_4) no desenvolvimento do método de QuEChERS foi devido à sua maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais. Além disso, a hidratação do MgSO_4 é uma reação exotérmica e resulta no aquecimento dos extratos entre 40 e 45 °C, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares (WILKOWSKA; BIZIUK, 2011; ZANELLA et al., 2015).

A melhor relação de sulfato de magnésio e cloreto de sódio ($\text{MgSO}_4/\text{NaCl}$) proposto inicialmente para a etapa de particionamento é 4:1 (m/m). Vale ressaltar que a qualidade do MgSO_4 utilizado no procedimento de extração também é importante, pois a capacidade de remover a água está relacionada com a pureza do sal (ANASTASSÍADES et al., 2003).

A limpeza dos extratos é essencial para promover confiabilidade e precisão dos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que a remoção dos interferentes da matriz aumenta a seletividade do método (DAS, 2014). Ademais, compostos não voláteis na matriz podem ficar aderidos no sistema

cromatográfico, alterando a resposta do sistema e aumentando a frequência de manutenção no equipamento.

Vários métodos analíticos empregam SPE na etapa de limpeza, a qual utiliza cartuchos ou colunas de plástico ou de vidro que contêm entre 250-2000 mg de sorvente. Usualmente, essa técnica envolve operação manual, uso de diferentes solventes para o pré-condicionamento da coluna, etapas de evaporação do solvente e secagem do extrato. Alguns fatores afetam a reprodutibilidade da técnica, entre eles o ajuste do sistema a vácuo e a vazão dos solventes. A SPE, quando automatizada, requer equipamentos caros e exige manutenções freqüentes (WILKOWSKA; BIZIUK, 2011).

A d-SPE proposta por Anastassiades et al. (2003) está baseada em um procedimento simples para ser empregado na limpeza de extratos destinados à análise cromatográfica de resíduos em alimentos. Na proposta original, o extrato é transferido para um frasco contendo o sorvente Amina Primária e Secundária (*Primary Secondary Amine* — PSA) e o MgSO_4 anidro. O PSA é adicionado como um agente de dispersão de fase ao invés de ser embalado em cartuchos de SPE. O PSA é um permutador aniônico fraco que interage fortemente com os compostos ácidos extraídos previamente (por exemplo, açúcares, ácidos graxos e ácidos orgânicos), removendo-os, assim, a partir do extrato. A adição de MgSO_4 remove a água residual presente no extrato e, conseqüentemente, aumenta a partição dos interferentes da matriz (em particular, ácidos graxos) no sorvente PSA (BRUZZONITI et al., 2014).

Quando comparada à técnica de SPE tradicional, a d-SPE apresenta algumas vantagens como o uso de uma menor quantidade de sorvente e solvente, refletindo em menor custo, tempo e trabalho. Por não haver a necessidade de usar cartucho, descartam-se as etapas prévias de pré-condicionamento. Na d-SPE, todo o sorvente interage igualmente com o extrato da matriz (WILKOWSKA; BIZIUK, 2011; BRUZZONITI et al., 2014; ZANELLA et al., 2015). Além disso, outra vantagem dessa técnica é a possibilidade de realizar combinações de diferentes sorventes (por exemplo, PSA, carbono grafitizado (GCB — *Grafitized Carbon Black*) e C18) de acordo com a necessidade (OSHITA; JARDIM, 2014). Aliado a isto está à possibilidade de remover a água residual de forma simultânea com a limpeza do extrato.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos principais, o desenvolvimento de um procedimento de incorporação do ABZ à ração a ser destinada aos peixes de modo a amenizar os riscos de lixiviação do fármaco para a água, e a realização de um estudo de depleção residual do ABZ e seus metabólitos em filé de pacu visando estimar e avaliar o período de carência a ser recomendado.

Os objetivos específicos compreenderam:

- i) Estudo de diferentes procedimentos para a incorporação do ABZ na ração;
- ii) Incorporação do ABZ à ração através da técnica de revestimento polimérico em equipamento de leito fluidizado;
- iii) Desenvolvimento e avaliação do método analítico empregando LC-MS/MS para a quantificação do ABZ na ração preparada;
- iv) Desenvolvimento e avaliação do método analítico empregando LC-MS/MS para a determinação de resíduos de ABZ e seus metabólitos em filé de pacu;
- v) Realização do experimento de depleção residual com peixes da espécie pacu a partir da administração do ABZ via ração;
- vi) Análise das amostras provenientes do experimento de depleção residual empregando o método analítico estabelecido;
- vii) Análise estatística dos resultados obtidos com o propósito de estimar e avaliar o período de carência a ser recomendado para o ABZ em filé de pacu.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Equipamentos e acessórios

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). O sistema cromatográfico utilizado (Shimadzu, Kyoto, Japão) era constituído por duas bombas LC10AD, um sistema controlador modelo SLC10A, um forno modelo CTO 10AS e um injetor automático modelo SIL 20A. O espectrômetro de massas utilizado foi composto por analisadores de massas triplo-quadrupolo (Quatro LC, Micromass, Manchester, UK) com uma interface de eletronebulização (*Electrospray ionization* – ESI), operando no modo positivo (ESI+). A aquisição e processamento dos dados foi efetuada através do software Micromass MassLynx, versão 4.1.

As temperaturas da fonte de ionização e de dessolvatação foram mantidas em 100°C e 350°C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e secagem sob vazões de 40 e 380 L h⁻¹, respectivamente. O argônio foi usado como gás de colisão.

Os fármacos usados no preparo das soluções-padrão, o metabissulfito de sódio e o PSA foram pesados em balança analítica da marca Shimadzu AUW220D (Shimadzu, Kyoto, Japão) devido à maior sensibilidade, enquanto que para a pesagem da ração, da carne, da etilcelulose e dos sais utilizados no método de QuEChERS foi utilizado uma balança semi-analítica da marca Marte AL 200C (Marte científica, São Paulo, Brasil).

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 leite 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).

Nos processos de extração dos analitos empregou-se um processador de alimentos (Philco, Santa Catarina, Brasil), um agitador de tubo tipo *vortex* modelo AP56 (Phoenix, São Paulo, Brasil), uma centrífuga refrigerada Himac CF5RX (Hitachi, Tóquio, Japão), um concentrador de amostras CentrVap (Labconco corporation, Kansas, EUA), um agitador horizontal modelo PA2479 (Pachane, São Paulo, Brasil) e um banho de ultrassom Maxiclean modelo USC-1450 (Unique, São Paulo, Brasil).

3.1.2. Reagentes e solventes

Todos os solventes utilizados no preparo da fase móvel foram de grau HPLC. Acetonitrila (ANC), metanol (MeOH) e ácido fórmico eram da marca J. T. Baker (Estado do México, México). O acetato de etila empregado nos ensaios de extração era da marca Grupo Química (Rio de Janeiro, Brasil). O acetato de sódio (NaAc) e o cloreto de sódio (NaCl) eram da Vetec química fina (Rio de Janeiro, Brasil). O sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) foi obtido junto a Sigma - Aldrich (São Paulo, Brasil) e o PSA utilizado era da marca Agilent Technologies (USA). A água utilizada nos experimentos foi purificada no sistema Milli-Q 3 UV System (Millipore, Alemanha).

Para o preparo de incorporação do ABZ na ração empregou-se matéria prima do ABZ e o álcool etílico 96 °GL, ambos adquiridos no comércio da cidade de Ribeirão Preto – SP. A etilcelulose foi gentilmente fornecida pela Colorcon do Brasil LTDA (São Paulo, Brasil).

3.1.3. Preparo de soluções

3.1.3.1. Soluções – padrão

As soluções estoques de albendazol (ABZ: 98%, Fluka Analytical – Sigma-Aldrich, China), albendazol sulfóxido (ABZSO: 99,9%, Fluka Analytical – Sigma-Aldrich, China) e fenacetina (FNC: 98%, Aldrich Chemistry – Sigma-Aldrich, China) foram preparadas em MeOH, na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Aos 50 mg de ABZ e ABZSO foram adicionados 3,0 mL de ácido fórmico e os volumes foram completados para 50 mL com MeOH.

Devido à baixa solubilidade do albendazol sulfona (ABZSO₂: 99,6%, Fluka Analytical – Sigma-Aldrich, China) e albendazol-2-aminosulfona (ABZ-2-NH₂SO₂: 99,6%, Fluka Analytical – Sigma-Aldrich, China) em MeOH, ambas as soluções estoques foram preparadas na concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$.

Para o preparo das soluções estoques de ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂, aos 0,25 mg de cada reagente padrão foram adicionados, respectivamente, 500 e 700 µL de ácido fórmico e os volumes foram completados para 25 mL com MeOH.

As soluções estoques foram armazenadas em frascos âmbar, mantidas em freezer à -20 °C, e foram utilizadas por um período de até três meses.

3.1.3.2. Soluções de trabalho

As soluções de trabalho utilizadas no desenvolvimento dos métodos analíticos para determinação de ABZ na ração e do ABZ e seus metabólitos no filé de pacu foram preparadas diariamente na concentração de 10 µg mL^{-1} e abaixo desta mediante diluições apropriadas da solução estoque com uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%.

A solução de metabissulfito de sódio, utilizada no método analítico desenvolvido para a determinação de resíduos de albendazol e seus metabólitos no filé de pacu, foi preparada diariamente na concentração de 8 mg mL^{-1} , através da diluição do metabissulfito de sódio em água destilada.

3.1.4. Ração comercial

Com o intuito de assegurar a qualidade nutritiva da ração a ser empregada nos estudos, fez-se uso da ração comercial da marca Purina® (SI CRESCIMENTO contendo 28% de proteína), adquirida no comércio da cidade de Piracicaba – SP, cuja composição nutricional pode ser verificada na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição da ração comercial utilizada no estudo.

Ração Nutripiscis (Purina®)	
Umidade (máxima)	100 g Kg ⁻¹
Proteína Bruta (mínima)	280 g Kg ⁻¹
Extrato Étereo (máxima)	40 g Kg ⁻¹
Matéria Mineral (máxima)	140 g Kg ⁻¹
Fibra Bruta (máxima)	100 g Kg ⁻¹
Cálcio (mínimo)	15 g Kg ⁻¹
Cálcio (máxima)	30 g Kg ⁻¹
Fósforo (mínimo)	6000 mg Kg ⁻¹
Vitamina C (mínimo)	200 mg Kg ⁻¹

3.1.5. Amostra branco de filé

As amostras branco de filé de peixe da espécie pacu foram provenientes do Setor de Piscicultura do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), na cidade de Piracicaba-SP, em condições de garantia de que o manejo de criação não fez uso de qualquer medicação. Os filés de pacu foram previamente triturados com o auxílio de um processador de alimentos, separadas em embalagens de 5g e armazenadas em freezer (-20°C) por um período de até três meses.

3.2. Métodos

3.2.1. Incorporação do albendazol na ração

A via de administração do medicamento aos peixes para a realização do estudo de depleção residual foi à oral, através da ração. Portanto, à ração comercial da marca Purina® fez-se a incorporação da matéria-prima do antiparasitário ABZ.

O método desenvolvido para incorporar o ABZ na ração visando o menor risco de perda do fármaco por lixiviação na água consistiu em revestir a ração com uma suspensão contendo o polímero e o fármaco.

A 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, foram adicionados 2 g de ABZ. A suspensão empregada no revestimento da ração foi mantida sob agitação constante em chapa aquecedora a 50 °C.

O processo de revestimento foi realizado em equipamento de leito fluidizado. A carga de péletes de ração adicionada à câmara de revestimento foi de 1000 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 2,0 m³ min⁻¹. A suspensão do polímero com o fármaco foi inserida na câmara de revestimento com vazão de 5 mL min⁻¹. O revestimento foi realizado em três etapas principais: aquecimento, revestimento e resfriamento. Ao todo, o processo durou cerca de 60 minutos.

3.2.2. Ensaio de lixiviação

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 seis péletes de ração em média). Os péletes de ração foram colocados em sacos de *nylon*, com malha de 1,0 mm, fechados com barbante e submersos em béqueres contendo 900 mL de água. Em seguida, os béqueres foram alocados em banho metabólico e submetidos à agitação branda. A temperatura e o pH da água foram monitorados e mantidos em 26 ± 1,5 °C e 7,1 ± 0,6, respectivamente. O ensaio de lixiviação foi realizado em triplicata.

Após o início dos ensaios, nos tempos de 5, 15, 30 e 60 minutos foram coletados alíquotas de 10 mL do meio aquoso, efetuando-se imediatamente após cada coleta, a reposição do mesmo volume de água (10 mL). A cada alíquota amostrada de 10 mL, foram adicionados 100 µL de ácido fórmico. Em seguida, as alíquotas foram filtradas com o auxílio de um filtro de membrana de celulose regenerada com porosidade de 0,20 µm de diâmetro. O filtrado foi transferido para um vial e 5,0 µL foram injetados no sistema LC-MS/MS.

3.2.3. Determinação do albendazol na ração

3.2.3.1. Método analítico empregando LC-MS/MS

As separações cromatográficas para a quantificação de ABZ na ração de peixe, fazendo uso de FNC como padrão interno, foram feitas utilizando-se como fase estacionária a coluna analítica de fase reversa X-Terra C18 MS (3,9 mm x 100 mm x 3,5 µm, Waters, EUA). A coluna de guarda X-Terra C18 MS (3,9 mm x 20 mm x 5 µm, Waters, EUA) foi usada para proteger a coluna analítica. A fase móvel foi composta por ACN: solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (40: 60 v/v), com vazão de 0,3 mL min⁻¹. O forno da coluna cromatográfica foi programado para manter a corrida cromatográfica sob a temperatura de 25 °C.

Após o ajuste das condições de monitoramento pelo espectrômetro de massas, a voltagem do cone foi definida em 20 V. A energia de colisão foi de 20 eV para o padrão interno e o ABZ. As análises foram realizadas no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM) das moléculas protonadas [M + H]⁺ e seus respectivos fragmentos. As transições monitoradas foram: m/z 266 > 234 para o ABZ e m/z 180 > 110 para a FNC.

3.2.3.2. Extração do albendazol da ração

À quantidade de 1,0 g de ração foram adicionados 2 mL de solução aquosa de ácido fórmico a 1%, sendo a mistura levada à agitação por *vortex* durante 30 segundos e, posteriormente, ao banho de ultrassom por 5 minutos. Em seguida, adicionaram-se 8 mL de MeOH e a solução foi homogeneizada em agitador horizontal por 15 minutos. Procedeu-se a centrifugação a 4 °C e 3500 rpm por 25 minutos. Uma alíquota de 500 µL foi coletada do sobrenadante e, em seguida, transferida para balão volumétrico de 10 mL. O volume do balão foi completado com uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%. O extrato obtido foi filtrado com o auxílio de um filtro de membrana de celulose regenerada, com porosidade de 0,20 µm de diâmetro e, posteriormente transferido para um vial. Um volume de 5 µL foi injetado no sistema LC-MS/MS. Um esquema do procedimento de extração descrito é representado na Figura 2.

Figura 2 – Representação esquemática do procedimento de extração do ABZ da ração.

Para a avaliação das condições estudadas no procedimento de extração da ração, foram analisadas as eficiências de extração obtidas para o ABZ 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 do ABZ foi realizada por uma curva de padronização externa, isto é, uma curva analítica obtida com o ABZ em solução. Todos os testes foram realizados em triplicata, sendo os resultados expressos como porcentagem do valor esperado.

3.2.3.3. Avaliação analítica do método desenvolvido

A capacidade analítica do método utilizado para a quantificação do ABZ na ração de peixe foi realizada com o intuito de assegurar a qualidade e a confiabilidade dos resultados. Para tanto, tomou-se como referência as recomendações do 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. Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, precisão e exatidão.

Seletividade: A seletividade do método desenvolvido foi avaliada de duas formas. Primeiro, pela comparação dos cromatogramas obtidos para a amostra branco e para a amostra branco fortificada com o ABZ e FNC, verificando a eventual presença de interferentes da matriz que pudessem estar coelundo com os analitos. Em segundo, avaliou-se o efeito matriz pela comparação da curva analítica obtida com os analitos em solução nas concentrações de 2, 3, 4, 5 e 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com a curva analítica obtida a partir do extrato fortificado com os analitos em concentrações (400, 600, 800, 1000 e 1200 $\mu\text{g g}^{-1}$) 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 dos analitos em solução, e expressos em porcentagem do valor esperado subtraído de 100%.

Linearidade: A curva analítica foi elaborada fortificando amostras de ração em seis níveis de concentração de ABZ: 400, 600, 800, 1000, 1200 e 1600 $\mu\text{g g}^{-1}$, com o padrão interno (FNC) mantido na concentração de 800 $\mu\text{g g}^{-1}$ em todos os níveis da curva. Para a fortificação da matriz, foi usado 1,0 g de amostra branco de ração, que recebeu a adição apropriada das soluções estoques de modo a se obter as concentrações apontadas acima. A linearidade foi expressa pelo coeficiente de regressão linear (r) da curva analítica.

Precisão: A avaliação da precisão do método desenvolvido foi dividida em duas medidas: precisão intradia (replicatas realizadas em um mesmo dia) e interdias (replicatas realizadas em dias diferentes).

A precisão intradia foi avaliada em três níveis de concentração do ABZ (400, 800 e 1200 $\mu\text{g g}^{-1}$), com o FNC mantida na concentração de 800 $\mu\text{g g}^{-1}$, mediante fortificação de amostras branco, analisadas em triplicata ($n=3$) em um mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e expressa como coeficiente de variação (CV, %).

A precisão interdias foi avaliada para os mesmos três níveis de concentração acima, mediante fortificação de amostras branco, analisadas em três dias diferentes ($n=3$). As análises foram realizadas pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e o resultado foi expresso pelo coeficiente de variação (CV, %).

Exatidão: A exatidão do método foi avaliada mediante teste de recuperação. Para tanto, uma solução contendo ABZ 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 ($n=3$). Os resultados foram calculados como porcentagens obtidas das concentrações dos analitos empregados na fortificação, e expressos na forma de faixas.

3.2.4. Determinação do albendazol e seus metabólitos no filé de peixe

3.2.4.1. Método analítico empregando LC-MS/MS

O ABZ e seus metabólitos, fazendo uso da FNC como padrão interno, foram separados em coluna analítica de fase reversa X-Terra C18 MS (3,9 mm x 100 mm x 3,5 μ m, Waters, EUA), com coluna de guarda X-Terra C18 MS (3,9 mm x 20 mm x 5 μ m, Waters, EUA). A fase móvel foi constituída por uma mistura de ACN: solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%, sob eluição por gradiente (Tabela 4). A vazão da fase móvel foi de 0,3 mL min⁻¹. O forno da coluna cromatográfica foi programado para manter a corrida cromatográfica sob a temperatura de 25 °C.

Tabela 4 – Gradiente utilizado no método cromatográfico desenvolvido para determinação do ABZ e seus metabólitos em filé de peixe.

Tempo (min)	% Solução A*	% Solução B**
0,0	90	10
3,0	45	55
5,0	45	55
6,0	10	90
9,5	10	90
10,5	90	10
17	90	10

*Solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% ** ACN

Após o ajuste das condições de monitoramento pelo espectrômetro de massas, a voltagem do cone foi definida em 20 V. A energia de colisão foi de 20 eV para o padrão interno (FNC), o ABZ e seus metabólitos. As análises foram realizadas no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM) das moléculas protonadas $[M + H]^+$ e seus respectivos fragmentos. As transições monitoradas para identificação e quantificação dos analitos estão descritas na Tabela 5:

Tabela 5 – Transições monitoradas para o ABZ e seus metabólitos.

Analito	Transição de quantificação (m/z)	Transição de identificação (m/z)
ABZ	266 > 234	266 > 191
ABZSO	282 > 240	282 > 208
ABZSO ₂	298 > 266	298 > 224
ABZ-2-NH ₂ SO ₂	240 > 133	240 > 198

3.2.4.2. Extração do albendazol e seus metabólitos do filé de peixe

O procedimento de extração tomou como base o método QuEChERS. À quantidade de 5,0 g de filé de pacu foram adicionados 300 μL da solução de metabissulfito de sódio (8 mg mL^{-1}) e 5 mL de ACN, sendo a mistura levada à agitação por *vortex* durante 1 minuto e, posteriormente, ao banho de ultrassom por 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 2 g de MgSO_4 anidro e 0,5 g de NaCl. Imediatamente após a adição dos sais, a mistura foi levada à agitação por *vortex* durante 1 minuto. A amostra foi centrifugada a 4°C e 3500 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 3,0 mL do sobrenadante foi coletada e transferida para um tubo falcon contendo 450 mg de MgSO_4 e 25 mg de PSA. O sistema foi agitado em *vortex* por 30 segundos e, posteriormente centrifugado a 4°C e 3500 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 2,0 mL do sobrenadante foi coletada, transferida para um tubo de vidro e evaporada em um concentrador de amostras a 50°C por 60 minutos. O resíduo foi reconstituído com 1 mL de uma mistura de ACN e solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (1:1 v/v), levado à agitação por *vortex* durante 30 segundos, filtrado com o auxílio de um filtro de membrana de celulose regenerada, com porosidade de 0,20 μm de diâmetro e, posteriormente transferido para um vial. Um volume de 5 μL foi injetado no sistema LC-MS/MS. Um esquema do procedimento de extração descrito é representado na Figura 3.

Para a avaliação das condições estudadas no procedimento de extração do filé de peixe, foram analisadas as eficiências de extração obtidas para o ABZ, ABZSO, ABZSO_2 , $\text{ABZ-2-NH}_2\text{SO}_2$ e FNC (PI). Para tanto, fez-se a fortificação da matriz branco de filé com os analitos e com o padrão interno em concentrações conhecidas. Com o intuito de assegurar a interação dos analitos com a matriz, a amostra foi deixada em repouso por 10 minutos antes de se iniciar o procedimento de extração. As concentrações dessas amostras foram calculadas através de curvas de calibração obtidas com os analitos em solução. Todos os testes foram realizados em duplicata, sendo os resultados expressos como porcentagem do valor esperado.

Figura 3 – Representação esquemática do procedimento de extração do ABZ e seus metabólitos no filé de pacu.

3.2.4.3. Avaliação analítica do método desenvolvido

Após a otimização do método de extração e definição dos parâmetros cromatográficos procedeu-se a avaliação da capacidade analítica do método. Para tanto, tomou-se como referência as recomendações do Manual de Garantia da Qualidade Analítica para Resíduos e Contaminantes em Alimentos, 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 restringiu 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.

Seletividade: 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, padrão interno e metabólitos, verificando a presença de interferentes da matriz que pudessem estar coeluído com os analitos. Em segundo, avaliou-se o efeito matriz pela comparação da curva analítica obtida com os analitos em solução nas concentrações de 0,02; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com a curva analítica obtida a partir do extrato fortificado com os analitos em concentrações (10, 50, 100, 150 e 200 ng g^{-1}) 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 dos analitos em solução, e expressos em porcentagem do valor esperado subtraído de 100%.

Linearidade: A curva analítica utilizada para a quantificação do ABZ e seus metabólitos no filé foi elaborada fortificando amostras branco de filé de peixe em cinco níveis de concentração: 10, 50, 100, 150 e 200 ng g^{-1} , com o padrão interno (FNC) mantido na concentração de 100 ng g^{-1} em todos os níveis da curva. Para a fortificação da matriz, foi usado 5,0 g de amostra branco de filé, que recebeu a adição apropriada das soluções estoques de modo a se obter as concentrações apontadas acima. A linearidade foi expressa pelo coeficiente de regressão linear (r) da curva analítica.

Precisão: A avaliação da precisão foi dividida em duas etapas (intradia e interdias). A precisão intradia foi avaliada usando amostras fortificadas e em corrida. Para as amostras fortificadas, a precisão intradia foi avaliada em três diferentes níveis de concentração do ABZ, ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂ em filé de peixe (50, 100 e 150 ng g^{-1}), com a FNC mantida na concentração de 100 ng g^{-1} . 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).

Para a avaliação da precisão intradia, em adição as amostras branco fortificadas, foram analisadas amostras em corrida, isto é, amostras de peixe que foram contaminadas com ABZ através da ração incorporada com o fármaco. No presente estudo, os peixes foram medicados com dose única de ABZ na concentração de 10 mg (kg peso vivo)⁻¹. As amostras em corrida foram obtidas a partir de dois peixes abatidos 8 horas após a interrupção da medicação.

Exatidão: A exatidão do método foi avaliada mediante teste de recuperação. Para tanto, uma solução contendo ABZ, ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂ foi utilizada para a fortificação de amostras branco de filé nos mesmos três níveis de concentração empregados na avaliação da precisão, com três repetições, uma em cada dia (n=3). Os resultados foram calculados como porcentagens obtidas das concentrações dos analitos empregados na fortificação, e expressos na forma de faixas.

Limite de decisão: (CC α): O limite de decisão do método foi estimado pela soma da concentração correspondente ao LMR mais 1,64 vezes o desvio padrão obtido no ensaio de precisão interdias.

Capacidade de detecção: (CC β): A capacidade de detecção do método foi obtida pela soma da concentração correspondente ao LMR mais 3,28 vezes o desvio padrão obtido no ensaio de precisão interdias.

3.2.5. Ensaio de depleção residual do albendazol e seus metabólitos em filé de pacu

3.2.5.1. Condições experimentais

Peixes da espécie pacu, comprados da Piscicultura Santa Cândida (Sítio Estância Santa Maria – Santa Cruz da Conceição, SP), foram aclimatados às condições das instalações do Setor de Piscicultura do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Piracicaba - SP. Os animais foram alocados em 8 caixas com capacidade de 1000 L (15 animais por

caixa) abastecidas por um sistema fechado de recirculação de água e aeração forçada (Figura 4). Durante todo o período do ensaio a temperatura, o pH e o oxigênio dissolvido foram medidos com o auxílio de uma sonda multiparâmetros da marca Horiba modelo U5000 (Kyoto, Japão). As médias dos parâmetros físico-químicos avaliados se encontram descritos na Tabela 6.

Figura 4 – Tanques utilizados para a realização do ensaio com os pacus.

Tabela 6 – Parâmetros físico-químicos da água das caixas durante o ensaio com os peixes.

Dias	Parâmetros físico-químicos da água		
	Temperatura (°C)	pH	Oxigênio (mg L ⁻¹)
1	24,83	8,05	6,33
2	24,16	8,25	6,52
3	24,35	8,31	6,5
4	24,67	8,35	6,48
5	25,03	8,22	6,33
6	23,65	8,42	6,46

3.2.5.2. Estudo de depleção

Para o ensaio do estudo de depleção residual do ABZ e seus metabólitos no filé de peixe, estabeleceu-se que a medicação seria fornecida via oral, através da ração, em dose única de 10 mg ABZ (kg peso vivo)⁻¹.

A alimentação dos peixes foi suspensa por 24 horas antes do início do experimento e o tratamento com a medicação foi iniciado simultaneamente para todos os peixes. No entanto, os animais foram abatidos em tempos diferentes. Em

cada período de abate foram selecionados aleatoriamente a partir das 8 caixas de tratamento, dez peixes. Os períodos avaliados foram de 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a medicação.

Os animais foram induzidos à morte através de imersão em solução de benzocaína. Após o abate, foi realizado o procedimento de retirada dos filés dos peixes (Figura 5). Na sequência, os filés foram embalados, identificados e armazenados em freezer (- 20 °C) até as análises (período inferior a um mês).

Figura 5 – Fotografias da sequência de procedimentos realizados para a coleta dos filés dos peixes.

Após o tratamento com o ABZ, os peixes voltaram a receber a ração isenta do fármaco. Durante todo o ensaio os animais receberam a quantidade diária de ração equivalente a 2% do peso vivo, com fornecimento dividido em duas partes iguais: de manhã e a tarde.

O desenvolvimento deste estudo foi aprovado e realizado em acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, protocolo nº 2015-34 (Anexo I).

Resultados e discussões

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Determinação de albendazol na ração

4.1.1. Método analítico empregando LC-MS/MS

Inicialmente, as condições de monitoramento dos compostos de interesse através do espectrômetro de massas foram otimizadas a partir de infusão direta dos analitos no analisador de massas. Posteriormente, as condições cromatográficas foram ajustadas com a finalidade de maximizar a detectabilidade do sinal analítico. Para tanto, foi utilizado uma coluna de fase reversa C18 e fase móvel composta por ACN: solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (40: 60 v/v). O tempo de análise foi inferior a dez minutos.

Figura 6 – Cromatograma característico da separação do ABZ e FNC (todos a 800 ug g⁻¹) da amostra branco de ração fortificada com esses analitos.

Um cromatograma característico de monitoramento do ABZ e do padrão interno (FNC) em amostra branco de ração fortificada com esses fármacos é apresentado na Figura 6. Embora a FNC seja estruturalmente diferente do ABZ (Figura 7), ela foi selecionada como padrão interno devido aos resultados satisfatórios obtidos na avaliação. Ademais, a FNC apresenta tempo de retenção próximo ao do ABZ e não é utilizada na medicina no nosso país.

Figura 7 – Estrutura química do ABZ e da FNC.

4.1.2. Extração do albendazol da ração

Inicialmente, estabeleceu-se o uso de 1 g de ração e o volume de 10 mL de solução extratora como condição base para o desenvolvimento do método. A primeira etapa de otimização do processo de extração do ABZ e da FNC (PI) na ração constituiu em selecionar uma solução extratora. A composição da solução extratora foi avaliada a partir de testes com diferentes solventes orgânicos (MeOH, ACN e acetato de etila), puros ou em mistura com solução aquosa de ácido fórmico a 1%. Observou-se que os melhores resultados de eficiência de extração (em torno de 90% para ABZ e em torno de 105% para FNC) foram obtidos empregando a mistura MeOH e solução aquosa de ácido fórmico a 1% (8:2, v/v).

Imediatamente após o procedimento de extração, era possível visualizar que o MeOH extraía menos interferentes da matriz do que a ACN, visto que os extratos eram mais límpidos e a eficiência de extração era maior.

A eficiência de extração dos analitos a partir de matrizes complexas está relacionada com a capacidade do método de eliminar interferentes. Para tanto, solventes orgânicos como MeOH e ACN são empregados na precipitação de proteínas.

Uma variedade de soluções extratoras incluindo água, ACN, acetato de etila e MeOH, puros ou em mistura entre si foram testadas por alguns autores. Cronly et al. (2010) relatam que uma mistura de MeOH e água extrai mais contaminantes da matriz do que a ACN, resultando em baixa recuperação dos analitos. Por outro lado, Robert et al. (2015) descrevem que o uso de MeOH como solução extratora auxilia na precipitação de proteínas e na eliminação de interferentes. Corroborando com nossos resultados, Borràs et al. (2011) obtiveram extratos menos límpidos quando a ACN foi utilizada como solvente extrator.

Além de testar as diferentes composições da solução extratora e a sua influência na eficiência de extração, avaliamos também, o emprego do banho de ultrassom durante o processo.

A extração assistida por ultrassom é um procedimento simples, eficiente, rápido e que não requer equipamento especial. O mecanismo de extração por ultrassom é atribuído ao comportamento das bolhas formadas pela cavitação na propagação das ondas mecânicas de baixa frequência. O colapso das bolhas facilita o processo de extração dos elementos, uma vez que aumenta a difusividade do solvente dentro das partículas sólidas. Em suma, o emprego do banho de ultrassom por um período de 5 minutos favoreceu a interação do ABZ com a solução extratora e dessa forma, aumentou a eficiência de extração (BENDICHO et al., 2012; MA et al., 2008; FREITAS et al., 2015).

4.1.3. Avaliação analítica do método para a ração

4.1.3.1. Seletividade

A comparação dos cromatogramas obtidos para a amostra branco de ração e a amostra branco fortificada com o ABZ e FNC (PI), conforme Figura 8, comprova a seletividade do método desenvolvido frente à ausência de interferentes presentes na ração.

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 8 – Cromatogramas característicos para (A) amostra branco de ração, (B) amostra branco fortificada com ABZ e (C) amostra branco fortificada com FNC (todas a $800 \mu\text{g g}^{-1}$).

4.1.3.2. Curva analítica, linearidade

A curva analítica foi construída mediante fortificação de amostras branco de ração em seis níveis de concentração (400 ; 600 ; 800 ; 1000 ; 1200 e $1600 \mu\text{g g}^{-1}$), usando a FNC ($800 \mu\text{g g}^{-1}$) como padrão interno. Após a fortificação, as amostras foram submetidas ao procedimento de preparo estabelecido para essa matriz. A curva analítica, a equação linear e o gráfico de resíduos obtidos para o ABZ estão apresentados na Figura 9.

A linearidade foi superior a $0,99$ e o gráfico de resíduos não demonstrou perfil de tendência, comprovando a adequação do método para a faixa de trabalho estabelecida.

Figura 9 – Curva analítica para determinação de ABZ na ração e o respectivo gráfico de resíduos.

4.1.3.3. Precisão

Para a avaliação de métodos em um único laboratório (*single-laboratory validation*), que é o enfoque proposto neste trabalho, duas etapas são relevantes para a obtenção da precisão: (i) precisão intradia e (ii) precisão interdias (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Para isso, foram empregadas amostras branco de ração, fortificadas com o fármaco nas concentrações de 400, 800 e 1200 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Expressando a precisão em termos de coeficiente de variação (CV), o MAPA (2011) recomenda que os resultados obtidos para a precisão intradia não excedam 15% do CV (exceto para a concentração de 1200 $\mu\text{g g}^{-1}$, a qual não deve exceder 10% do CV). Em condições de repetitividade, o coeficiente de variação deve tipicamente situar-se abaixo de dois terços dos valores apresentados acima, conforme a concentração correspondente.

Como pode ser visualizado na Tabela 7, os resultados de precisão intradia e interdias para o ABZ estão de acordo com o guia de validação (MAPA, 2011).

4.1.3.4. Exatidão

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada mediante teste de recuperação, com amostras branco de ração fortificadas com o ABZ em três níveis de concentração, repetidas em dias diferentes ($n=3$). Os resultados obtidos foram transformados em porcentagem da quantidade conhecida do analito após desenvolvimento do procedimento de extração. Com pode ser observado na Tabela 7, os resultados obtidos estão de acordo coma faixa de aceitação (97 a 103%) preconizada pelo MAPA (2011).

Tabela 7 – Parâmetros de avaliação analítica do método de determinação de ABZ na ração.

Parâmetros	ABZ
Linearidade (r)	> 0,99
Precisão intradia (CV, %)	
400 ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$)	0,81
800 ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$)	0,61
1200 ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$)	0,28
Precisão interdias (CV, %)	
400 ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$)	0,39
800 ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$)	1,03
1200 ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$)	0,59
Exatidão (Teste de recuperação, %)	
400 ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$)	99,3
800 ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$)	100,9
1200 ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$)	99,12

4.1.4. Avaliação do processo de incorporação do albendazol na ração

Uma possível alternativa para garantir a redução da lixiviação de substâncias medicamentosas no ambiente aquático é a utilização de rações revestidas com polímeros.

O fármaco pode ser incorporado na ração antes e/ou durante o processo de revestimento. Quando o fármaco é adicionado à ração triturada e passa por um processo de compressão, forma um comprimido medicamentoso. Se o comprimido apresentar uma dureza adequada, poderá ser submetido ao processo de revestimento. A principal vantagem de incorporar o fármaco na ração antes do

processo de revestimento consiste em maior segurança quanto à ingestão do medicamento pelo peixe.

Quando o fármaco é incorporado na ração durante o processo de revestimento, o preparo de uma suspensão do polímero com o fármaco se faz necessário. A suspensão é aspergida sobre a superfície do pélete de ração resultando em um filme homogêneo de polímero e fármaco. Esse processo se caracteriza pela simplicidade de produção. Uma das principais vantagens desse processo está no fato de que a ração não precisa ser triturada para incorporar o fármaco e dessa forma, mantém suas características de flutuabilidade, facilitando a ingestão pelos peixes.

No presente estudo, ambos os processos de incorporação de fármaco na ração foram testados. Contudo, devido à grande dificuldade de se obter comprimidos com dureza adequada para resistir ao processo de revestimento optamos por adicionar o fármaco na ração durante o processo de revestimento. Ademais, a trituração da ração compromete a flutuabilidade do pélete e dificulta o monitoramento por parte do produtor quanto à ingestão do medicamento pelos peixes.

Em decorrência do processo de produção de comprimidos não se mostrar adequado para os objetivos do projeto, a produção da ração medicada passou a ser realizada com o auxílio de um esferonizador. As dificuldades no processo permaneceram, resultando em péletes desuniformes. A velocidade e o tempo de rotação do esferonizador foram modificadas durante os ensaios na tentativa de adquirir condições adequadas para produção de péletes uniformes, contudo, não se obteve resultados satisfatórios. O processo era de baixo rendimento, com perdas significativas de material.

Devido à simplicidade, rapidez e eficiência do processo, o ABZ passou a ser incorporado na ração por um processo de revestimento.

O polímero utilizado no processo de revestimento deve ter baixa solubilidade em água, baixo custo, capacidade de mascar o sabor do fármaco e, principalmente, não ser tóxico. Considerando que o pacu (espécie de peixe empregada no presente estudo) se alimenta de folhas e frutos ricos em celulose, optou-se pelo uso da etilcelulose como polímero de revestimento (SOUZA et al., 2003; VISENTAINEL, 2008).

Quanto ao nível de ABZ a ser incorporado na ração, considerou-se o trabalho de Shaikh et al. (2003) que preconiza o valor de dosagem diária de ABZ em 10 mg do fármaco por Kg de peixe. O peixe adulto consome diariamente 2% de ração em relação a seu peso corpóreo. Assim, considerando que os peixes serão alimentados duas vezes ao dia (de manhã e à tarde), que o peso médio de cada peixe utilizado neste estudo é de 500 g e que o ABZ será administrado em dose única, a ração deve conter 1,0 g ABZ por Kg de ração. Considerando possíveis perdas envolvidas no processo de revestimento, a ração medicada foi preparada visando conter 2,0 g de ABZ por Kg.

Após avaliar o método para a determinação de ABZ na ração, empregando LC-MS/MS, procedeu-se a análise em triplicata da ração preparada com ABZ (Tabela 8), obtendo-se o resultado de concentração média de 1,42 g por kg de ração produzida, indicando que houve perda de 29% de ABZ durante processo de incorporação na ração. Contudo, os resultados para as replicatas (n = 3) indicaram boa uniformidade de incorporação do fármaco na ração, com CV de 1,36%.

Tabela 8 – Análise da ração preparada com ABZ.

Replicatas	Concentração de ABZ (g kg ⁻¹)	Média	CV (%)
1	1.41	1,42	1,36
2	1.44		
3	1.40		

4.2. Ensaio de lixiviação

A liberação do fármaco no ambiente aquático pode prejudicar a qualidade da água utilizada no cultivo e o tratamento dos animais. Dessa forma, o processo de lixiviação é um aspecto importante a ser abordado quando os medicamentos são administrados via ração. Os resultados obtidos para a porcentagem de perda do fármaco durante o ensaio de lixiviação podem ser visualizados na Tabela 9.

As recomendações para que a ração fique disponível na água até que seja consumida pelo peixe é de até dez minutos (CANTELMO, 2002), o que implica

que a estabilidade do grânulo de ração é fundamental para reduzir a perda de nutrientes e principalmente, a perda de fármaco. O revestimento da ração com polímero favorece a estabilidade do grânulo e protege o fármaco do processo de lixiviação. Isso confere segurança ao ensaio de depleção residual, haja vista que a concentração do fármaco na ração não sofrerá alterações significativas durante a permanência do alimento na água.

Tabela 9 – Porcentagem de perda de ABZ em função do tempo.

Tempo de coleta (min.)	Porcentagem média de fármaco liberada
5	0,19*
15	0,17*
30	1,13
60	5,96

* Valores inferiores à precisão do método (Tabela 7, pág. 55)

O ensaio de lixiviação mostrou que o revestimento da ração é uma estratégia promissora. No período de trinta minutos, apenas 1,13% do medicamento presente na ração foi liberado para a água.

Considerando que a ração permaneça em contato com a água durante 60 minutos, a perda de medicamento não será superior a 6%. Esses dados demonstram que o processo de revestimento preserva a integridade da ração, mantém constância na concentração do fármaco e proporciona maior período para que o peixe doente possa se alimentar, sem que haja perdas significativas do fármaco para o ambiente.

4.3. Determinação do albendazol e seus metabólicos no filé de peixe

4.3.1. Método analítico empregando LC-MS/MS

Inicialmente, as condições de monitoramento dos compostos de interesse através do espectrômetro de massas foram otimizadas a partir de infusão direta dos

analitos no analisador de massas. Posteriormente, as condições cromatográficas foram ajustadas com a finalidade de maximizar a detectabilidade do sinal analítico.

A eluição isocrática não promoveu uma separação adequada da FNC, ABZ e seus metabólitos, em um tempo razoável de análise. Verificou-se que o ABZ e a FNC apresentam maior afinidade pela fase estacionária do que os demais analitos, o que leva a um aumento do tempo de retenção e prejudica a análise. Desta forma, para otimizar o tempo de análise e garantir a separação dos fármacos foi necessário empregar uma eluição por gradiente, sob vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$.

Um cromatograma característico da separação da FNC, ABZ, ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂ em amostra branco de filé fortificada com esses fármacos, é apresentado na Figura 10. Embora a FNC seja estruturalmente diferente do ABZ, ela foi selecionada como padrão interno devido aos resultados satisfatórios obtidos na avaliação. Ademais, a FNC apresenta tempo de retenção próximo ao do ABZ e não é utilizada na medicina no nosso país.

Figura 10 – Cromatogramas característicos da amostra branco de filé de pacu fortificada com ABZ, ABZSO, ABZSO₂, ABZ-2-NH₂SO₂ e FNC (PI) na concentração de 100 ng g^{-1} , após procedimento de extração.

4.3.2. Extração do albendazol e seus metabólitos do filé de peixe

Embora todos os benzimidazóis tenham a mesma estrutura química fundamental, com um anel benzeno e um grupo imidazol, eles apresentam diferenças nas propriedades químicas, especialmente em termos de pKa e polaridade, sendo que essas diferenças são mais agudas entre o fármaco original e os seus metabólitos. Somado a isso, a complexidade das amostras em estudo (filé de pacu) e os baixos níveis de concentração em que os fármacos podem ser encontrados no filé, o preparo de amostra passa a ser uma importante etapa de análise para a obtenção de resultados confiáveis.

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, ABZ e seus metabólitos em filé de peixe.

As etapas do processo de extração foram definidas em função de testes preliminares, avaliando quanto do analito estava sendo recuperado e se o procedimento era eficaz para a remoção de interferentes da matriz. Um detalhe importante do procedimento de extração foi à necessidade de utilizar 300 µL de uma solução de metabissulfito de sódio (8 mg mL^{-1}) para evitar a oxidação do ABZSO durante o preparo da amostra.

Inicialmente, como etapa de preparo da 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 para o desenvolvimento do método, estabeleceu-se a quantidade de 5 g de amostra. A composição da solução extratora foi avaliada com o uso de 10 mL de ACN pura, ACN contendo 0,1% de ácido fórmico e ACN contendo 1% de ácido fórmico. Apesar das diferenças de polaridade entre o ABZ e seus metabólitos a ACN pura foi capaz de extrair esses analitos com maior eficiência e seletividade do que a ACN acidificada. Para manter a razão solvente/amostra com a proporção de 1:1 (v/m), o volume utilizado de ACN foi reduzido para 5 mL. Essa relação mostrou ser adequada para obter uma boa eficiência de extração. Além

disso, contribuiu para a redução do volume de solvente utilizado no preparo da amostra.

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. Dessa forma, optamos por prosseguir os testes de extração com a ACN.

O método de QuEChERS original empregam procedimento de agitação manual ou com auxílio de agitadores do tipo *vortex* por um período de 1 minuto. Contudo, observamos que a agitação por *vortex* (1 minuto) seguida do banho de ultrassom (10 minutos) favoreceu a interação dos analitos com a solução extratora e aumentou a eficiência de extração.

Em seguida, avaliou-se a influência do sal empregado no processo de partição. O estudo demonstrou que tanto o cloreto de sódio quanto o acetato de sódio podem ser utilizados no processo de extração sem que haja diferenças significativas na eficiência de extração. Optou-se por utilizar o cloreto de sódio.

O sulfato de magnésio é um sal secante utilizado na etapa de partição para remover a água presente na matriz (filé de peixe). A melhor relação de sulfato de magnésio e cloreto de sódio, proposta por Anastassiades et al. (2003), para a etapa de particionamento é de 4:1.

Para a etapa de limpeza dos extratos, foi considerado o uso de dois sorventes (C18 e PSA). Os melhores resultados foram obtidos com o emprego do sorvente PSA. Além disso, a quantidade de PSA foi aumentada de 25 mg para 50 mg, sem diferenças significativas na eficiência de extração. Assim, optou-se por continuar o processo de extração com 25 mg de PSA.

Na tentativa de desenvolver um método com poucas etapas de extração/pré-concentração da amostra, fez-se uso de injeção direta da amostra no sistema LC-MS/MS. Contudo, a grande quantidade de ACN presente na amostra aliada a baixa força da fase móvel empregada no início da análise resultou na formação de picos distorcidos. Dessa forma, quando a amostra era injetada diretamente no sistema havia dificuldade de quantificar o analito ABZ-2-NH₂SO₂.

Neto (2009) descreve dois processos utilizados para minimizar a influência do solvente orgânico na separação cromatográfica. O volume de solução

injetada no sistema pode ser reduzido ou a amostra pode ser submetida a um procedimento de secagem seguido pela reconstituição do resíduo em solvente fraco.

Considerando que o volume de solução injetado no sistema é relativamente baixo (5 μL), procedeu-se a secagem da amostra e em seguida, a reconstituição em uma mistura de ACN e solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (1:1 v/v). O procedimento final para a extração do ABZ e seus metabolitos no filé de pacu resultou em eficiências de extração de cerca de 100% para todos os analitos.

4.3.3. Avaliação analítica do método para o filé de pacu

4.3.3.1. Seletividade

A comparação dos cromatogramas obtidos para a amostra branco de filé de pacu e a amostra branco fortificada com o ABZ e seus metabolitos na concentração de 100 ng g^{-1} , conforme Figura 11, 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.

4.3.3.2. Curva analítica, linearidade

As curvas analíticas foram construídas mediante fortificação de amostras branco de filé em cinco níveis de concentração (10; 50; 100; 150 e 200 ng g^{-1}), usando a FNC (100 ng g^{-1}) como padrão interno. Após a fortificação, as amostras foram submetidas ao procedimento de preparo estabelecido para essa matriz. As curvas analíticas obtidas para o ABZ, ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂, as respectivas equações lineares e os gráficos de resíduos estão apresentados na Figura 12.

O método desenvolvido apresentou linearidade superior a 0,99, para todos os analitos. Os gráficos de resíduos não apresentaram perfis de tendência que demonstrasse eventual necessidade de ponderação ou falta de ajuste na linearidade. Dessa forma, verifica-se que a adequabilidade do método para a faixa linear estabelecida.

Figura 11 – Cromatogramas característicos para (A) amostras branco de filé de pacu, (B) amostra branco fortificada com ABZ, (C) amostra branco fortificada com ABZSO, (D) amostra branco fortificada com ABZSO₂, (E) amostra branco fortificada com ABZ-2-NH₂SO₂ e (F) amostra branco fortificada com FNC (PI) (todos a 100 ng g⁻¹).

Figura 12 – Curvas analíticas e gráficos de resíduos para o ABZ, ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂ obtidas para o método desenvolvido para a quantificação dessas substâncias por LC-MS/MS.

4.3.3.3. Precisão

Para a avaliação de métodos em um único laboratório (*single-laboratory validation*), que é o enfoque proposto neste trabalho, duas etapas são relevantes para a obtenção da precisão: (i) precisão intradia e (ii) precisão interdias (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Para isso, foram empregadas amostras branco de filé de pacu, fortificadas com os fármacos em três níveis de concentração: 50, 100 e 150 ng g⁻¹.

A precisão intradia foi avaliada através da análise de amostras fortificadas e em corrida. As amostras fortificadas foram avaliadas em três níveis de concentração do ABZ e seus metabólitos (50, 100 e 150 ng g⁻¹). O procedimento foi realizado em triplicata (n=3) para cada nível de concentração, com repetições no mesmo dia. As amostras incorrida foram obtidas a partir de dois peixes abatidos 8 horas após a interrupção da medicação, de modo que apenas o ABZ e o ABZSO foram detectados nos níveis de concentração de trabalho. A precisão interdia foi avaliada para os mesmos três níveis de concentração descritos acima, com repetições em três dias diferentes.

Expressando a precisão em termos de coeficiente de variação (CV), o MAPA (2011) recomenda que os resultados obtidos para a precisão não excedamos valores descritos na Tabela 10.

Tabela 10 – Critérios de aceitação da precisão.

Concentração (c)	Coeficiente de variação (CV) (%)	
	Precisão intradia	Precisão interdias
$10 \text{ ng g}^{-1} \leq c < 100 \text{ ng g}^{-1}$	20%	13,33%
$100 \text{ ng g}^{-1} \leq c < 1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$	15%	10%

Os resultados de precisão intra e interdias para o ABZ e seus metabólitos estão apresentados na Tabela 11 e se encontram de acordo com os valores preconizados pelo guia de validação do MAPA (2011).

4.3.3.4. Exatidão

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada mediante teste de recuperação, com amostras branco de filé de pacu fortificadas com o ABZ, ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂ em três níveis de concentração (50, 100 e 150 ng g⁻¹), repetidas em dias diferentes (n=3). Os resultados obtidos foram transformados em porcentagem da quantidade conhecida do analito após desenvolvimento do procedimento de extração. Com pode ser observado na Tabela 11, os resultados obtidos estão de acordo coma faixa de aceitação (80 a 110%) preconizada pelo MAPA (2011).

Tabela 11 – Parâmetros de avaliação analítica do método de determinação do albendazol e seus metabólitos no filé de pacu.

Parâmetros	ABZ	ABZSO	ABZSO ₂	ABZ-2-NH ₂ SO ₂
Linearidade (r)	> 0,99	> 0,99	> 0,99	> 0,99
Precisão intradia (amostras fortificadas, CV, %)				
50 (ng g ⁻¹ , n=3)	5,4	9,6	11,3	3,1
100 (ng g ⁻¹ , n=3)	1,9	3,8	3,4	1,9
150 (ng g ⁻¹ , n=3)	3,3	4,9	3,5	3,0
Precisão intradia (amostras incorrida, CV, %)				
^a 48,7 (ng g ⁻¹ , n=3)	6,3	-	n.d	n.d
^b 54,8 (ng g ⁻¹ , n=3)	5,5	-	n.d	n.d
^a 174,2 (ng g ⁻¹ , n=3)	-	0,6	n.d	n.d
^b 194,4 (ng g ⁻¹ , n=3)	-	3,3	n.d	n.d
Precisão interdias (CV, %)				
50 (ng g ⁻¹ , n=3)	2,8	4,8	1,6	3,0
100 (ng g ⁻¹ , n=3)	5,1	12,9	5,7	9,4
150 (ng g ⁻¹ , n=3)	3,0	7,6	3,3	5,5
Exatidão (Recuperação, %)				
50 (ng g ⁻¹ , n=3)	99,4	99,4	99,3	96,7
100 (ng g ⁻¹ , n=3)	101,9	105,9	105,2	101,3
150 (ng g ⁻¹ , n=3)	99,9	96,8	99,4	98,9
CC α (ng g ⁻¹)	108,4	122,4	109,9	115,7
CC β (ng g ⁻¹)	116,9	144,8	119,8	131,3

^{a, b}: amostras de dois peixes (a e b) usados para as análises das amostras em corrida
n.d: não detectado

4.3.3.5. Limite de Decisão (CC α) e Capacidade de Detecção (CC β)

Para as substâncias com LMR definidos, o CC α e CC β são sempre maiores que o LMR, devendo ser o mais próximo possível dele. Os valores obtidos se encontram descritos na Tabela 11.

4.4. Ensaio de depleção residual

A espécie de peixe empregada no ensaio de depleção residual foi o pacu, devido ao seu excelente potencial para a produção intensiva, principalmente pela fácil adaptação e boas taxas de crescimento. Ademais, o pacu apresenta ótima aceitação no mercado consumidor pela qualidade de sua carne. Por essas razões e devido à falta de informações sobre o metabolismo do ABZ em espécies nativas, o pacu foi escolhido como modelo biológico desse experimento.

A Agência Européia de medicamentos (EMA, 2009) apresenta um guia de recomendações para estudos de depleção residual em animais produtores de alimentos, na qual recomenda que um número suficiente de peixes (15 a 20) deve ser utilizado para obter pelo menos dez indivíduos para cada momento de amostragem. No presente estudo, para avaliar a depleção do ABZ e seus metabólitos em filé de pacu e estabelecer o período de carência, grupos de peixes com quinze indivíduos foram alocados em 8 caixas de 1000 L. Após a administração da ração contendo o fármaco, foram selecionados aleatoriamente entre as caixas, dez animais para cada período de abate (4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas).

4.4.1. Análise das amostras provenientes do ensaio de depleção

Para cada período de abate selecionado para o estudo de depleção do ABZ e seus metabólitos no filé de pacu, foram analisadas amostras de dez peixes. As análises foram realizadas conforme método desenvolvido neste trabalho (Figura 3, p. 44).

Os parâmetros físico-químicos (temperatura, pH e oxigênio dissolvido) da água das caixas que comportaram os peixes durante todo o ensaio, foram monitoradas durante o período de estudo, conforme apresentado na Tabela 6.

4.4.2. Avaliação dos resultados de depleção do albendazol e seus metabólitos em filé de pacu

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, sendo descrita por um termo exponencial. Baseado nisto, os dados do estudo de depleção residual do ABZ e seus metabólitos foram analisados assumindo-se o modelo de eliminação cinética de um compartimento:

$$C_t = C_0 e^{-kt} \quad [1]$$

Mediante o emprego do programa computacional GraphPadPrism® (versão 5.0), foram avaliados os modelos matemáticos não lineares para cada resíduo marcador (ABZ e cada um de seus metabólitos), sendo escolhido em cada caso, o modelo que melhor se ajustou ao respectivo perfil de depleção. As curvas de depleção conforme os diferentes marcadores monitorados são apresentadas na Figura 13 e os parâmetros de ajustes do modelo matemático para cada gráfico obtido estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12 – Parâmetros do ajuste do modelo matemático não linear para as curvas de depleção residual conforme os marcadores monitorados.

Parâmetros de ajuste não linear	ABZ	ABZSO	ABZSO₂	ABZ-2-NH₂SO₂
Graus de liberdade	48	64	39	64
Coeficiente linear (r^2)	0,1725	0,3757	0,2149	0,006713
Soma absoluta dos quadrados	15777	445603	28019	708981
Desvio (Sy.x)	18,13	83,44	26,80	105,3

Figura 13 - Gráficos das curvas de depleção residual para os diferentes marcadores residuais a partir dos modelos matemáticos de ajustes não lineares adotados. Onde LMR significa Limite Máximo de Resíduo.

Como pode ser observado na Figura 12, apenas o perfil de depleção do ABZ foi melhor ajustado pelo modelo de Decaimento de Primeira Ordem, enquanto que os demais marcadores residuais foram melhor ajustados pelo modelo Quadrático (Polinomial de Segunda Ordem). Essa característica já era esperada, considerando que o ABZ é rapidamente convertido em seu principal metabólito farmacologicamente ativo, o ABZSO.

Na sequência da cadeia metabólica do ABZ, o ABZSO é oxidado em ABZSO₂ e em seguida, o grupo carbamato também é rapidamente desacetilado, levando à formação ABZ-2-NH₂SO₂. Este último metabólito, assim como o ABZSO₂, não apresenta atividade farmacológica (CAPECE; VIRKEL; LANUSSE, 2009; MOLINA et al., 2007).

Devido ao extenso metabolismo de primeira passagem, o ABZ apresenta baixas concentrações teciduais em comparação aos seus metabólitos, ABZSO e ABZSO₂. O ABZ-2-NH₂SO₂, por sua vez, foi detectado após os três primeiros períodos de abate monitorado, sendo que sua concentração se manteve praticamente constante nos demais períodos. Como resultado, verifica-se a

importância de realizar o estudo de depleção residual com a análise da concentração do ABZ e seus metabólitos no tecido alvo.

Atualmente, não há uma harmonização entre os órgãos que estabelecem o LMR para o ABZ. Há uma divergência entre o resíduo marcador escolhido e até mesmo a concentração permitida no tecido alvo (músculo). Ainda que diferentes valores de LMR adotados pelas agências reguladoras possam ser justificados de acordo com o hábito alimentar da população envolvida, a escolha do resíduo marcador para o monitoramento do uso do ABZ deve ser muito criteriosa.

A organização de saúde do Canadá (*Health Canada*) e o *Codex Alimentarius* estabelecem os LMR de 50 ng g^{-1} e 100 ng g^{-1} , respectivamente, para o resíduo de ABZ em tecido muscular, tendo o metabólito ABZ-2-NH₂SO₂ como marcador (CODEX ALIMENTARIUS, 2016; HEALTH CANADA, 2016). Já, a EMA estabelece para o monitoramento residual de ABZ no tecido muscular, o LMR de 100 ng g^{-1} expressos como a soma das concentrações individuais de ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂. Neste caso, não é claro se a concentração individual de ABZ é incluída nesta soma de marcadores (EMA, 2004). No presente trabalho a concentração individual do ABZ foi incluída na soma dos marcadores.

No Brasil, o valor de LMR estabelecido para o ABZ em matriz muscular é de 100 ng g^{-1} . No entanto, o PNCRC não menciona qualquer especificação sobre o monitoramento dos metabólitos (BRASIL, 2015).

Considerando a recomendação estabelecida pela EMA, projetou-se um gráfico a partir de um modelo não linear para a soma de todos os resíduos, sendo que o mesmo foi melhor ajustado pelo modelo quadrático (Figura 14). Os parâmetros de ajuste do modelo matemático quadrático para o gráfico da curva de depleção residual da soma de todos os marcadores estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13 – Parâmetros do ajuste do modelo matemático não linear para a curva de depleção residual da soma de todos os marcadores residuais.

Parâmetros de ajuste não linear	Soma de todos os marcadores
Graus de liberdade	64
Coeficiente linear (r^2)	0,3681
Soma absoluta dos quadrados	615863
Desvio ($Sy.x$)	98,10

Figura 14 – Gráfico da curva de depleção residual para a soma de todos os marcadores residuais do uso de ABZ a partir do modelo matemático quadrático de ajuste adotado. Onde LMR significa Limite Máximo de Resíduo.

Pode-se observar que o perfil de depleção para a soma de todos os marcadores é muito semelhante ao perfil obtido para a depleção do ABZSO. Por ser o principal metabólito do ABZ, o ABZSO atinge altas concentrações teciduais e devido a isso, apresenta maior influência na tendência da curva de depleção.

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 Agência America de Drogas e Alimentos (*Food and Drug Administration* – FDA) recomenda empregar 99% de percentil e 95% de confiança para essa avaliação. Para estabelecer o período de carência, 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 (FDA, 2006). Dessa forma, a equação [1] na escala logarítmica fica:

$$\log C_t = \ln C_0 - kt = \log C_0 - \frac{k}{2,303} t \quad [2]$$

A partir da equação [2] nota-se que há uma relação linear entre a concentração transformada logarítmica e o tempo. Disto, a equação [2] pode ser reescrita a partir da regressão linear:

$$y = a_{yx} + b_{yx}x \quad [3]$$

Onde a_{yx} e b_{yx} são estimados do $\log(C_0)$ e $-(k/2,303)$, respectivamente.

Assim sendo, procedeu-se a regressão linear da fase terminal de depleção para cada um dos marcadores monitorados, a partir das concentrações obtidas transformadas pela função logarítmica neperiana (Ln), sendo os gráficos apresentados na Figura 15. Os parâmetros de ajuste linear para cada gráfico de regressão estão descritos na Tabela 14.

Figura 15 – Gráficos das retas de depleção residual para os diferentes marcadores residuais a partir das respectivas regressões. (LMR) é o Limite Máximo de Resíduo; (a) é a reta obtida da regressão linear; (b) é a reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c) é a reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%; (PC_{95/95}) Período de Carência com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (PC_{95/99}) Período de Carência com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%.

Tabela 14 – Parâmetros do ajuste das regressões lineares das curvas de depleção residual conforme os marcadores monitorados.

Parâmetros de ajuste linear	ABZ	ABZSO	ABZSO ₂	ABZ-2-NH ₂ SO ₂
Coeficiente de regressão	-0,01231 ± 0,003238	-0,05560 ± 0,006170	-0,01371 ± 0,003779	0,0009118 ± 0,002886
Y-intercepto	3,732 ± 0,1087	10,28 ± 0,6045	5,428 ± 0,3703	2,624 ± 0,2801
X-intercepto	303,1	185,0	396,0	-2878
Coeficiente de regressão ⁻¹	-81,22	-17,98	-72,95	1097

Para a soma de todos os resíduos também foi projetado um gráfico a partir de um modelo linear (Figura 16). Os parâmetros de ajuste linear estão descritos na Tabela 15.

Figura 16 – Gráfico da reta de depleção residual considerando a soma de todos os diferentes marcadores residuais a partir da regressão linear. (LMR) é o Limite Máximo de Resíduo; (a) é a reta obtida da regressão linear; (b) é a reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c) é a reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%; ($PC_{95/95}$) Período de Carência com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; ($PC_{95/99}$) Período de Carência com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%.

Tabela 15 – Parâmetros do ajuste da regressão linear para a curva de depleção residual da soma de todos os marcadores residuais.

Parâmetros de ajuste linear	Soma de todos os marcadores
Coeficiente de regressão	-0,03919 ± 0,004861
Y-intercepto	9,254 ± 0,4763
X-intercepto	236,1
Coeficiente de regressão ⁻¹	-25,52

É importante destacar que nem todos os tempos de abate realizados, cujas amostras foram analisadas, foram incluídos na regressão linear. Apenas os pontos identificados como fazendo parte da fase terminal de depleção, isto é, aqueles em que se identificou nitidamente a queda na concentração do marcador avaliado, foram incluídos.

Para comprovar a validade da regressão linear, é importante verificar se as seguintes premissas foram atendidas:

- Homogeneidade das variâncias dos dados de concentração transformados na função logarítmica para cada ponto de abate;
- Linearidade dos dados de concentração transformados na função logarítmica para cada ponto de abate;
- Distribuição normal dos erros de ajuste

A avaliação da homogeneidade dos dados obtidos para cada um dos marcadores residuais monitorados, bem como para a soma deles, foi realizada pelo teste de Bartlett, recomendado pela FDA, cujos resultados estão sumarizados na Tabela 16.

Tabela 16 - Teste de Bartlett para avaliação da homogeneidade das variâncias.

Resíduo marcador	Valor testado	Graus de liberdade	Probabilidade	Significância
ABZ	1,509	5	P>0,05	Não significativo
ABZSO	0,928	2	P>0,05	Não significativo
ABZSO ₂	1,504	2	P>0,05	Não significativo
ABZ-2-NH ₂ SO ₂	0,1224	2	P>0,05	Não significativo
Soma dos marcadores	2,284	2	P > 0,05	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. Quando todos os peixes recebem a medicação através da ração, ocorre uma competição natural pelo alimento entre os animais, o que pode promover diferenças na ingestão do fármaco entre eles. Para tanto, a separação dos animais em caixas contendo 15 indivíduos cada facilitou o manejo experimental e pode ter contribuído para que a homogeneidade dos resultados estivesse dentro da aceitação, conforme revelou os testes de Bartlett.

Ainda, a falta de ajuste para cada regressão linear foi verificada através do teste ANOVA, sendo os resultados sumarizados na Tabela 17. Verifica-se que não houve desvio significativo da linearidade para os marcadores avaliados.

Tabela 17 – Avaliação do ajuste da linearidade das regressões dos diferentes marcadores residuais.

Marcador	Fonte da variação	G.I.	Ss	Ms	Teste f	Parecer
ABZ	Entre grupos	4	0,459	0,115	2,243 ^a	Sem desvio significativo da linearidade
	Dentro de cada grupo	46	2,355	0,051	2,574 ^b	
ABZSO	Entre grupos	1	0,008	0,008	0,098 ^a	Sem desvio significativo da linearidade
	Dentro de cada grupo	27	2,305	0,085	4,210 ^b	Sem desvio significativo da linearidade
ABZSO ₂	Entre grupos	1	0,0001	0,0001	0,005 ^a	Sem desvio significativo da linearidade
	Dentro de cada grupo	27	0,8670	0,0321	4,210 ^b	Sem desvio significativo da linearidade
Soma dos marcadores	Entre grupos	1	0,008	0,008	0,144 ^a	Sem desvio significativo da linearidade
	Dentro de cada grupo	27	1,428	0,0529	4,210 ^b	Sem desvio significativo da linearidade

^avalor do teste de Bartlett testado; ^bvalor do teste F tabelado

Não foi possível fazer a avaliação do ajuste da linearidade para a depleção do ABZ-2-NH₂SO₂, visto que a falta significativa de um número de valores da concentração deste marcador em vários animais analisados inviabilizou a aplicação do teste F.

Como último passo para avaliar a regressão linear, foi realizado o teste de normalidade para os resultados de cada marcador. Para tanto, procedeu-se o teste de Shapiro-Wilk, recomendado pela EMA (95) e a avaliação do gráfico obtido da frequência de distribuição normal dos erros de ajuste, conforme apresentado na Tabela 18 e Figura 17.

Tabela 18 – Teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos erros de ajuste.

Resíduo marcador	Valor testado	Número de amostras (n)	Probabilidade	Significância
ABZ	0,9799	52	P>0,05	Não significativo
ABZSO	0,9613	30	P>0,05	Não significativo
ABZSO ₂	0,9872	30	P>0,05	Não significativo
ABZ-2-NH ₂ SO ₂	0,9406	26	P>0,05	Não significativo
Soma dos marcadores	0,9568	30	P>0,05	Não significativo

Figura 17 – Gráficos de distribuição normal dos erros do ajuste das regressões lineares.

A avaliação da normalidade dos erros de ajuste tanto através do teste de Shapiro-Wilk, como através da visualização dos gráficos de dispersão normal, não apontaram um grau importante de significância, qualificando o modelo de regressão linear adequado para os todos os dados de depleção residual obtidos.

Os períodos de carência estimados a partir das regressões lineares ilustradas nas Figuras 14 e 15 são descritos na Tabela 19.

Tabela 19 – Períodos de carência estimados para os diferentes marcadores residuais monitorados nos estudos de depleção em filé de pacu.

Período de Carência		Resíduo marcador monitorado				
		ABZ	ABZSO	ABZSO ₂	ABZ-2-NH ₂ SO ₂	Soma
PC _{95/95}	Horas	16	128	123	n.i.	150
	*Dias	1	6	6	n.i.	7
PC _{95/99}	Horas	45	137	154	n.i.	163
	*Dias	2	6	7	n.i.	7

PC_{95/95}: Período de Carência com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%

PC_{95/99}: Período de Carência com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%

* Os valores de PC, expressos em dias, foram sempre extrapolados para valores inteiros

n.i.: Não identificado

Como mencionado, não há um consenso entre as organizações responsáveis por estabelecer o valor de LMR para o ABZ no tecido muscular de animais destinados ao consumo. Há, ainda, divergência quanto o resíduo marcador que deve ser monitorado e quanto ao valor do LMR no tecido alvo. Essas diferenças fazem com que o período de carência a ser estabelecido seja também variável, pois está diretamente relacionado com o LMR.

A FDA recomenda que o período de carência seja avaliado com o emprego de 95% de confiança e 99% de limite de tolerância. Assim, os resultados do presente projeto serão discutidos com base nesta recomendação.

Se considerarmos o LMR de 100 ng g⁻¹ estabelecido pela EMA, que considera como resíduo marcador a soma das concentrações de ABZ, ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂, temos que o período de carência estimado para o uso do ABZ em filé de pacu é de sete dias. Por outro lado, se seguirmos as recomendações do *Codex Alimentarius* e da Agência de Saúde do Canadá, não haveria a necessidade de período de carência para o uso de ABZ em pacu, visto que essas agências consideram o ABZ-2-NH₂SO₂ como resíduo marcador, o qual não foi identificado em concentrações acima dos LMR adotados (100 e 50 ng g⁻¹,

respectivamente) em nenhum período de abate avaliado no ensaio de depleção realizado.

O PNCRC estabelece o LMR de 100 ng g^{-1} para a concentração residual de ABZ em tecido muscular de bovinos, suínos e em leite, ou seja, nenhum metabólito é considerado. Tomando como base as recomendações deste plano e as estendendo para o possível monitoramento do ABZ em peixes, o período de carência seria estimado em dois dias. No entanto, o ABZ consiste em um pró-fármaco, que é rapidamente convertido no seu metabólito ativo, o ABZSO, o qual é o responsável pelo efeito terapêutico e toxicológico. Diante disso, seria necessária uma revisão do PNCRC no que diz respeito à escolha do resíduo marcador e à extensão do programa para o monitoramento de resíduos de ABZ em pescado.

Dentre as organizações que estabelecem o LMR para o ABZ em tecido muscular, a EMA é a que garante maior segurança toxicológica alimentar para o consumidor, visto que contempla em seu LMR a soma do fármaco original e de seus metabólitos. Assim, o período de carência mais adequado para o ABZ em filé de pacu seria de sete dias. No entanto, é importante considerar que períodos de carência acima do necessário para garantir a segurança do consumidor, podem trazer prejuízos consideráveis ao produtor, visto que aumenta o período de espera para o abate dos animais, gerando gastos desnecessários com o consumo de ração.

Nota-se que nenhuma organização utiliza a concentração individual do ABZSO₂ como resíduo marcador. Contudo, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que ele é o metabólito mais persistente no tecido muscular. Dessa forma, verifica-se que o ABZSO₂ demonstra potencial para ser utilizado como resíduo marcador.

Se o ABZSO₂ for selecionado como resíduo marcador e o valor de LMR for mantido em 100 ng g^{-1} , o período de carência seria estimado em sete dias. Diante disso, verifica-se que o período de carência estimado para o ABZSO₂ seria idêntico ao estimado para a soma do fármaco original e dos seus metabólitos.

Ademais, a literatura reporta que o ABZ-2-NH₂SO₂ pode não ser o marcador ideal, visto que algumas espécies de peixes não apresentam concentrações significativas deste metabólito no tecido muscular.

Shaikh et al. (2006) avaliaram a depleção de ABZ e seus metabólitos em músculo de bagre-americano, após uma medicação de dose única, por gavagem oral, na concentração de $10 \text{ mg (Kg de peso vivo)}^{-1}$. O ABZ e o ABZSO foram

metabolizados rapidamente, enquanto o ABZSO₂ permaneceu por mais tempo no tecido muscular. O ABZ-2-NH₂SO₂ não foi detectado nas amostras do estudo, o que sugere que o bagre-americano apresenta baixas concentrações deste metabólito ou não é capaz de formar o mesmo. Diante disso, os autores sugerem que o ABZSO₂ apresenta potencial para ser nomeado como resíduo marcador.

Em 2009, Shaikh et al. estudaram a depleção residual do ABZ e seus metabólitos em outras duas espécies de peixes, o achigã e a robalo riscado híbrido. Uma dose única de ABZ, na concentração de 10 mg (Kg de peso vivo)⁻¹, foi administrada através de gavagem oral. Os resultados obtidos indicam que o ABZ e o ABZSO são eliminados mais lentamente no achigã do que no robalo riscado híbrido. O ABZ foi detectado até 8 horas e 48 horas em robalo riscado híbrido e achigã, respectivamente. O ABZSO foi detectado até 48 horas e 96 horas em robalo e em achigã, respectivamente. Dos metabólitos inativos, o ABZSO₂ estava presente em ambas as espécies de peixes, enquanto o ABZ-2-NH₂SO₂ foi detectado apenas na espécie de peixe achigã. Os autores concluem que o ABZ-2-NH₂SO₂ poderia ser utilizado como resíduo marcador para o achigã, enquanto o ABZSO₂ apresenta potencial para ser utilizado como marcador no robalo riscado híbrido.

YU et al. (2011) continuaram os estudos de depleção residual do ABZ e seus metabólitos em músculo de peixe. Neste estudo, os pesquisadores utilizaram a perca amarela. O ABZ foi administrado por gavagem oral na concentração de 10 mg (Kg de peso vivo)⁻¹. O fármaco original, o ABZ, foi rapidamente esgotado sendo detectado apenas até 24 horas após a administração. O seu metabólito ativo, o ABZSO, manteve concentrações elevadas (195 ng g⁻¹) até 48 horas após a medicação. Após 72 horas, a concentração de ABZSO caiu para 30 ng g⁻¹ e foi reduzindo até não ser mais detectada no tecido muscular. O ABZSO₂ atingiu o pico em 48 horas com a concentração de 461 ng g⁻¹ e em seguida, sua concentração foi diminuindo gradualmente. O ABZ-2-NH₂SO₂ foi detectado em apenas um animal do estudo, sendo que as concentrações encontradas no período de 72 horas e 96 horas foram muito baixas (11 e 21 ng g⁻¹, respectivamente). Similar ao estudo com robalo riscado híbrido e com bagre-americano, os autores sugerem que o ABZSO₂ pode servir como um marcador potencial para identificar o uso do ABZ nessas espécies de peixe.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

O processo de revestimento da ração com uma suspensão contendo o ABZ e o polímero etilcelulose apresentou várias vantagens, entre elas: uniformidade da dose do fármaco nos péletes de ração, facilidade e rapidez no processo de produção, menor taxa de lixiviação do fármaco para a água e flutuabilidade da ração. Dessa forma, verifica-se que o processo de revestimento constitui um avanço na incorporação de medicamentos em rações comerciais que pode contribuir para o desenvolvimento do setor aquícola.

Os métodos analíticos desenvolvidos para a determinação da concentração do ABZ na ração desenvolvida e para a determinação do ABZ e seus metabólitos no filé de pacu apresentaram resultados satisfatórios para o fim a que se destinam, sendo que os dados da avaliação da garantia da qualidade analítica se encontram em conformidade com os guias de validação do Ministério de Agricultura Pecuária e Desenvolvimento, tomados como referência neste trabalho.

O ensaio com os peixes da espécie pacu permitiu estabelecer curvas de depleção do ABZ e seus metabólitos 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 pacu, após administração oral de dose única de 10 mg de ABZ (Kg peso vivo)⁻¹, é capaz de metabolizar o ABZ em ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂. O ABZ é metabolizado rapidamente, sendo o ABZSO₂ o metabólito mais persistente. A falta de uma harmonização entre as organizações responsáveis por estabelecer o valor de LMR para o ABZ no tecido muscular de animais destinados ao consumo humano gera uma divergência quanto o resíduo marcador que deve ser monitorado, bem como, a concentração máxima permitida (LMR) no tecido alvo. Diante disso, o período de carência a ser recomendado pode sofrer variações. Assim, a estimativa do período de carência é dependente da legislação que está sendo seguida.

Considerando o LMR de 100 ng g⁻¹ estabelecido pela EMA para a soma das concentrações individuais de ABZ, ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂, o período de carência para o ABZ em filé de pacu foi estimado em sete dias.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com os reportados na literatura, verifica-se a necessidade de estabelecer um marcador residual que seja

efetivo para as principais espécies comercializadas. Para isso, estudos sobre a depleção residual do ABZ e seus metabólitos devem ser realizados em diferentes espécies de peixes.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

BAÑUELOS, J. A. et al. Advanced oxidation treatment of malachite Green dye using a low cost carbon-felt air-difusion cathode. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 2, p. 2066-2075, 2016.

BATISTÃO, M. B. **Metabolismo in vitro do albendazol em escala miligrama e purificação por cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa**. 2013. 119 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

BELAZ, K. R. A. **Quantificação dos metabólitos do albendazol em plasma bovino por cromatografia líquida quiral de alta eficiência, com injeção direta de amostras**. 2007. 148 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

BENDICHO, C. et al. Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of Green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 50-60, 2012.

BÉNÉ, C. et al. Contribution of fisheries and aquaculture to food security and poverty reduction: assessing the current evidence. **World Development**, v. 79, p. 177-196, 2016.

BORRÀS, S.; COMPANYÓ, R.; GUITERAS, J. Analysis of sulfonamides in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5240-5247, 2011.

BOISON, J. O; TURNIPSEED, S. B. A review of aquaculture practices and their impacts on chemical food safety from a regulatory perspective. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 3, p. 541-549, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria Ministerial nº 51, de 06 de fevereiro de 1986. Dispõe sobre a instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal - PNCRB. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 fev. 1986.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995. Dispõe sobre a adequação do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal - PNCRB. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 ago. 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada Nº 253, de 16 de setembro de 2003. Cria o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 14, de 25 de maio de 2009. Aprova os Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado para o exercício de 2009. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 mai. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 13, de 15 de julho de 2015. Publica o subprograma de monitoramento e subprograma exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC de 2015 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, eqüina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 jul. 2015.

BRUZZONITI, M. C. et al. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 4089-4116, 2014.

BULDINI, P. L.; RICCI, L.; SHARMA, J. L. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 47-70, 2002.

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.

CAPECE, B. P. S.; VIRKEL, G. L.; LANUSSE, C. E. Enantiomeric behaviour o albedazole and febendazole sulfoxides in domestic animals: Pharmacological implications. **The Veterinary Journal**, v. 181, n. 3, p. 241-250, 2009.

CARRASCHI, P. S., et al. Effectiveness of therapeutic agents in disease treatment in *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v. 431, p. 124-128, 2014.

CHIAP, P. et al. Determination of albendazole and its main metabolites in ovine plasma by liquid chromatography with dialysis as an integrated sample preparation technique. **Journal of Chromatography A**, v. 870, p. 121-134, 2000.

CHOI, S. Development and verification for analysis of pesticides in eggs and egg products using QuEChERS and LC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1236-1242, 2015.

CODEX ALIMENTARIUS. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br> >. Acesso em: 20 out. 2016.

CREPALDI, D. et al. A situação da aquicultura e da pesca no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.30, p. 81-85, 2007.

CRONLY, M. et al. Development and validation of a rapid multi-class method for the confirmation of fourteen prohibited medicinal additives in pig and poultry compound feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 929-938, 2010.

DAS, S. K. Recent developments in clean up techniques of pesticide residue analysis for toxicology study: a critical review. **Universal Journal of Agricultural Research**, p. 199-203, 2014.

DAYAN, A. D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. **Acta Tropica**, v.86, p. 141-159, 2003.

DEFOIRDT, T; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 251-258, 2011.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 637-646, 2007.

DMITRIENKO, S. G. et al. Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection – a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 850, p. 6-25, 2014.

DULAURENT, S. et al. QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 5, p. 1467-1474, 2016.

EUROPEAN COMMISSION - EC. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, 2002.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY – EMA. **Committee for medicinal products for veterinary use**. London, UK: EMEA/MRL/865/03-FINAL, 2004.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY – EMA. **Guideline on studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: marker residue depletion studies to establish product withdrawal periods**. London, UK: EMEA/CVMP/VICH/463199/2009-CONSULTATION, 2009.

FALLAH, A. A.; BARANI, A. Determination of malachite Green residues in farmed rainbow trout in Iran. **Food Control**, v. 40, p. 100-105, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**. Roma, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Guidance for industry: general principles for evaluating the safety of compounds used in food-producing animals**. Rockville, 2006.

FEUCHT, Y.; ZANDER, K. Of earth ponds, flow-through and closed recirculation systems – german consumer's understanding of sustainable aquaculture and its communication. **Aquaculture**, v. 438, p. 151-158, 2015.

FREITAS, P. C. et al. Extração assistida por ultrassom para determinação colorimétrica de ferro em solo: uma comparação com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 570-574, 2015.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á. et al. Evolution and applications of the QuEChERS method. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 169-185, 2015.

HEALTH CANADA. List of maximum residue limits (MRLs) for veterinary drugs in foods. Disponível em: < <http://www.hc-sc.gc.ca> >. Acesso em: 20 out. 2016.

HERCEGOVÁ, A.; DÖMÖTÖROVÁ, M.; MATISOVÁ, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 54-73, 2007.

HORVAT, A. J. M. et al. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 61-84, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL–INMETRO. Disponível em: <<http://www.infoconsum.gov.br>>. Acesso em: 09 set. 2016.

JIANG, B. et al. In vivo anthelmintic effect of flavonol rhamnosides from *Dryopteris crassirhizoma* against *Dactylogyrus intermedius* in goldfish (*Carassius auratus*). **Parasitology Research**, v. 112, n. 12, p. 4097-4104, 2013.

KANG, J. et al. Simultaneous determination of multi-class veterinary drug residues in different muscle tissues by modified QuEChERS combined with HPLC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 6, n. 16, p. 6285-6293, 2014.

KINSELLA, B. et al. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p. 7977-8015, 2009.

KLIMEK-TUREK, A. et al. Frontally eluted components procedure with thin layer chromatography as a mode of sample preparation for high performance liquid chromatography quantitation of acetaminophen in biological matrix. **Journal of Chromatography A**, v. 1436, p. 19-27, 2016.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. de A. C. **Dicionário terapêutico Guanabara**. 16. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review. **Analytical and Bionalytical Chemistry**, v. 389, n. 6, p. 1663-1683, 2007.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; YUN, S. J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 630-638, 2005.

LIMA dos SANTOS, C. A. M.; HOWGATE, P. Fishborne zoonotic parasites and aquaculture: a review. **Aquaculture**, v. 318, p. 253-261, 2011.

LOPES, R. P. et al. Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 896, p. 39-47, 2012.

LU, L. et al. Biometric Elisa detection of malachite Green based on magnetic molecularly imprinted polymers. **Journal of Chromatography B**, v. 1035, p. 25-30, 2016.

MA, Y. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of satsuma mandarin (*citrus unshiu* Marc.) peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5682-5690, 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO– MAPA. **Manual da garantia da qualidade analítica**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2011. 227 p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO– MAPA. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2011. 72 p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO–MAPA. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 09 set. 2016.

MOLINA, A. J. et al. Absorption and metabolism of albendazole after intestinal ischemia/reperfusion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, p. 16-24, 2007.

MULIA-YÉPEZ, L. et al. Evaluation of albendazole prodrugs in experimental trichinellosis. **Archives of Medical Research**, v. 30, p. 368-374, 1999.

NETO, A. J. S. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida – parte I. **Scientia Chromatographica**, n. 3, v. 1, p. 69-77, 2009.

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

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. Comparison of different sorbents in the QuEChERS method for the determination of pesticide residues in strawberries by LC-MS/MS. **Chromatographia**, v. 77, p. 1291-1298, 2014.

PAVANELLI, G.; EIRAS, J.; TAKEMOTO, R. **Doenças de peixes**: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 2nd ed. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2002. 305 p.

PERICÁS-CHÁFER, C. et al. Multiresidue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation. Comparison of immunoassay vs LC-MS-MS. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 993-999, 2011.

PIATKOWSKA, M.; JEDZINIAK, P.; ZMUDZKI, J. Comparison of different sample preparation procedures for multiclass determination of selected veterinary drug, coccidiostat and insecticide residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, n. 9, p. 3034-3044, 2014.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

RATHOD, D. M. et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of albendazole and albendazole sulfoxide in human plasma for bioequivalence studies. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 4, p. 226-234, 2016.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. **Open Chemistry**, v. 13, p. 980-1010, 2015.

REVERTER, M. et al. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. **Aquaculture**, v. 433, p. 50-61, 2014.

RICO, A.; VAN DEN BRINK, P. J. Probabilistic risk assessment of veterinary medicines applied to four major aquaculture species produced in Asia. **Since of the Total Environment**, v. 468-469, p. 630-641, 2014.

ROBERT, C. Rapid multiresidue and multi-class screening for antibiotics and benzimidazoles in feed by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Control**, v. 50, p. 509-515, 2015.

RODRIGUES, S. A. et al. Otimização e validação de método empregando quechers modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 780-786, 2011.

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

SANTOS, L.; RAMOS, F. Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p. 16-30, 2016.

SCHMAHL, G., BENINI, J. Treatment of fish parasites. 11. Effects of different benzimidazole derivatives (albendazole, mebendazole, fenbendazole) on *Glugea anomala*, Moniez, 1887 (Microsporidia): ultrastructural aspects and efficacy studies. **Parasitology Research**, v. 84, p. 41–49, 1998.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS—SEBRAE. **Aquicultura no Brasil: série estudos mercadológicos**. Brasília, DF, 2015.

SHAIKH, B. et al. Metabolism and residue depletion of albendazole and its metabolites in rainbow trout, tilapia and Atlantic salmon after oral administration. **Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 421–427, 2003.

SHAIKH, B. et al. Metabolism and depletion of albendazole in the muscle tissue of channel catfish following oral treatment. **Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, p. 525–530, 2006.

SHAIKH, B. et al. Residue depletion of albendazole and its metabolites in the muscle tissue of large mouth and hybrid striped bass after oral administration. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8173–8176, 2009.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL-SINDAN. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br>>. Acesso em: 09 set. 2016.

SPEARE, D.J. et al. A preliminary investigation of alternatives to fumagillin for the treatment of *Loma salmonae* infection in rainbow trout. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, n. 3, p. 241-248, 1999.

SPINOSA, H. de S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

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.

SOMOGYI, A. et al. Scientific issue related to Codex Alimentarius goals: A review of principles, with examples. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 60, p. 161-164, 2011.

SOUZA, V. L. et al. Avaliação do crescimento e do custo da alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Revista Brasileira de zootecnia**, v. 32, p. 19-28, 2003.

SUBASINGHE, R.; SOTO, D.; JIA, J. Global aquaculture and its role in sustainable development. **Reviews in Aquaculture**, v. 1, p. 2-9, 2009.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TIDWELL, H. J.; ALLAN, G. L. Fish as food: aquaculture's contribution. **EMBO Reports**, v. 2, n. 11, p. 958-963, 2001.

TOJO, J.L.; SANTAMARINA, M.T. Oral pharmacological treatments for parasitic diseases of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. I: *Hexamita salmonis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 33, p. 51-56, 1998.

TYAPKOVA, O. et al. Replacing fishmeal with oilseed cakes in fish feed – A study on the influence of processing parameters on the extrusion behavior and quality properties of the feed pellets. **Journal of Food Engineering**, v. 191, p. 28-36, 2016.

VISENTAINEL, J. **Estudos dos processos digestivos proteolítico e amilohidrolítico de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), alimentados com níveis crescentes de proteína**. 2008. 63 f. Dissertação

(Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food**. Geneva, 2009. 42 p.

WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 125, p. 803-812, 2011.

WU, Z. et al. Development and optimization of a rapid HPLC method for analysis of ricobendazole and albendazole sulfone in sheep plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 225-232, 2005.

YU, D. et al. Residue depletion of albendazole and its metabolites in aquacultured yellow perch (*Perca flavescens*). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, p. 560-562, 2011.

ZANELLA, R. et al. QuEChERS. In: BORGES, K. B; FIGUEIREDO, E. C; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015. cap. 24, p. 230-244.

ZHANG, L. et al. A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 900-925, 2012.

ZHANG, X. et al. Simultaneous determination of albendazole and its metabolites in fish muscle tissue by stable isotope dilution ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 2, p. 727-734, 2011.

Anexo

7. ANEXO

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Fone: (19) 3429-4400
www4.esalq.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Estudo de depleção residual de albandazol em filé de peixe", protocolo nº 2015-34 sob a responsabilidade do Dr. Jonas Augusto Rizzato 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 nº11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA, e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ/USP, em reunião de 21/09/2015.

Vigência do Projeto	23/11/2015 a 30/08/2016
Espécie/Linhagem	Peixe – <i>Piaractus mesopotamicus</i>
Nº de animais	195
Peso/Idade	500g/adulto
Sexo	195 macho e fêmeas
Origem	Piscicultura Santa Cândida – Sítio Estância Santa Maria, Santa Cruz da Conceição – São Paulo.

CERTIFICATE

This is to certify that the study "Estudo de depleção residual de albandazol em filé de peixe", protocol number 2015-34, under the responsibility of Dr. Jonas Augusto Rizzato (Principal Investigator) has been approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, College of Agriculture "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP, Brazil, University of São Paulo.

Prof. Dr. José Fernando Machado Menten
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - ESALQ/USP