UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estimativa e avaliação do período de carência do albendazol e seus
metabólitos em filés de peixe**

Ana Carolina Velloso Portela

Ribeirão Preto

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estimativa e avaliação do período de carência do albendazol e seus metabólitos em filés de peixe

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado (a): Ana Carolina Velloso Portela

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

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 03/06/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2019

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.

Portela, V. Ana Carolina

Estimativa e avaliação do período de carência do albendazol e seus metabólitos em filés de peixe. Ribeirão Preto, 2019.

105 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. Albendazol
2. Aquicultura.
3. Período de carência.
4. LC-MS/MS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Ana Carolina Velloso Portela

Título do trabalho: Estimativa e avaliação do período de carência do albendazol e seus metabólitos em filés de peixe.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP 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: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter me dado o que há de mais valioso: minha vida.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal**, por aceitar orientar-me, pelo apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho, pela consideração, paciência, atenção e todos os conselhos.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto** e à **Universidade de São Paulo**, pelo suporte e infraestrutura disponibilizados para a realização do trabalho.

Ao técnico de laboratório, **Agnaldo**, pela amizade e pelo suporte na execução deste trabalho.

Ao **Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”** de Jaboticabal e a **Prof. Dra. Fabiana Pilarski** e seus orientados, em especial ao **Raphael Barbeta**, pelo auxílio na condução do experimento com os peixes.

À minha mãe, **Adriana**, meu pai, **Nicolau** e minha irmã, **Larissa**, por toda a confiança e carinho dedicados, fazendo-me acreditar que tudo é possível quando realmente se quer. Por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões e por encorajar-me nos momentos em que mais precisei. Meus exemplos de vida e de amor.

Ao **Marcos** pelo amor, pelo apoio, compreensão e pelo companheirismo. Obrigada por estar comigo em todos os momentos, sejam eles felizes ou difíceis.

Aos meus colegas de laboratório, **Marina, Juliana, Sarah, Carlos, João, Jonas**, pelos bons momentos, pela ajuda, amizade e pela troca de conhecimentos.

Aos meus familiares, avós, tios e primos, pelos conselhos e por sempre estarem presentes em minha vida.

A todos os meus amigos que estiveram comigo nessa trajetória. Em especial, a **Jéssica, Luiza, Beatriz, Camila, Assunta, Marcos, Rodrigo, Marina e Juliana**. Levarei vocês para sempre em minha vida.

Ao ***Institute for Global Food Security (Queen's University)***, ao **Prof. Dr. Mark Mooney e a Dra. Anna Gadaj** por me concederem a honra de estar com vocês por seis meses em Belfast, pelo trabalho e todos os ensinamentos, que contribuíram para me tornar uma profissional ainda melhor. A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro através do Projeto 2012/18334-0 e pelas bolsas de estudos 2016/16593-9 (mestrado) e 2017/26290-6 (BEPE).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e
aprende o que ensina.”*

Cora Coralina

RESUMO

PORTELA, V. A. C. **Estimativa e avaliação do período de carência do albendazol e seus metabólitos em filés de peixe**. 2019. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Atualmente, a aquicultura é o sistema de produção de alimentos de origem animal que mais cresce no mundo. O uso de medicamentos veterinários é de extrema importância em todo sistema de produção de alimentos de origem animal para tratar e prevenir doenças. Todavia, existem poucos fármacos regulamentados no Brasil para serem administrados a espécies aquícolas no combate a doenças infecciosas, de modo que diante deste cenário de carência de alternativas de medicamentos veterinários 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, ou mesmo de substâncias proibidas. Tal prática pode levar à presença de resíduos dessas substâncias no alimento, colocando em risco a segurança toxicológica alimentar dos consumidores. O Albendazol (ABZ) é um antiparasitário de amplo espectro utilizado para tratamento de parasitos helmintos no trato intestinal, muito utilizado na área veterinária para bovinos, ovinos e caprinos, e já comprovada eficácia para peixes, porém seu uso ainda não é regulamentado para uso na piscicultura. Tendo em vista o potencial do ABZ como alternativa de fármaco a ser usado na aquicultura e o processo para a sua regulamentação, o presente trabalho visou: (i) incorporar o antiparasitário na ração para peixes através de uma suspensão com solução de gelatina a 5% (m/m); (ii) realizar o estudo de depleção residual do ABZ e seus principais metabólitos e estimar o período de carência destes em filés de tilápia e patinga empregando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). A suspensão do fármaco com a solução de gelatina a 5% (m/m) permitiu incorporar o ABZ na ração sem alterar a estrutura da mesma, permitiu a homogeneidade da dose e baixas taxas de lixiviação para a água. O ABZ foi isolado da ração por extração líquido-líquido. O ABZ e seus metabólitos foram extraídos dos filés (músculo e pele em proporções naturais) pelo método de QuEChERS. A separação cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa octadecil híbrida. Para avaliar a capacidade analítica do método e avaliar sua confiabilidade, realizou-se a validação analítica do método, tomando como base as recomendações do guia VICH GL49, guia destinado a estudos de depleção residual de produtos veterinários em animais destinados ao consumo (FDA 2015). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, seletividade, precisão e exatidão intradia e interdia, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ). Todos os parâmetros avaliados estão de acordo com os guias de validação usados como referência nesse trabalho. Para o estudo de depleção do ABZ e seus metabólitos nos filés de tilápia e patinga, os peixes receberam o fármaco em dose única de 10 mg de ABZ (kg peso vivo)⁻¹. A curva de depleção residual do ABZ e seus metabólitos para a patinga se ajustou ao modelo quadrático, porém não foi possível construir a curva de depleção residual para a tilápia. O período de carência foi estimado em três dias para a patinga.

Palavras-chaves: Albendazol; LC-MS/MS; piscicultura; depleção residual; período de carência; QuEChERS

ABSTRACT

PORTELA, V. A. C. **Estimation and evaluation of withdrawal periods for albendazole and its metabolites in fish.** 2019. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Currently, aquaculture is the fastest growing food production system in the world. The use of veterinary drugs is of great importance in any system of animal production to treat and prevent diseases. However, there are few drugs regulated in Brazil to be administered to aquaculture species. Due to the lack of alternatives for veterinary drugs and the high cost of available medicines, there is a suspicion that fish farmers are resorting to irregular use of prescribed substances for other animal species, or even banned substances. Such practice may lead to the presence of residues of these substances in food, posing a risk to consumer's toxicological safety. Albendazole (ABZ) is a broad-spectrum anti-helminth, which is widely used for cattle, sheep and goats, and it is already proven effective for fish, but its use is not yet approved for fish farming. Considering the potential of ABZ as a drug alternative for use in aquaculture systems and its process of regulation, the present project aimed to: (i) incorporate ABZ in feed through a suspension with 5% gelatin solution (w/w) and (ii) carry out a residual depletion study of ABZ and its main metabolites and estimate the withdraw period in tilapia and patinga fillets using high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). Suspension of ABZ with 5% (w/w) gelatin solution allowed incorporation into the feed without altering the physical structure of the same, allowing dose homogeneity and low leaching rates to water. ABZ was isolated from the feed by liquid-liquid extraction. ABZ and its metabolites were extracted from fish fillets (muscle and skin in natural proportions) by QhEChERS procedure. Chromatographic separation was performed by hybrid octadecyl reverse phase column. To evaluate reliability of the method, analytical validation was performed, based on recommendations VICH GL49 guide. The methods were evaluated by the following parameters: selectivity, analytical curves, linearity, precision and accuracy. All parameters are according to the validation guides. For ABZ depletion study, fishes received a single dose of 10 mg of ABZ (kg live weight)⁻¹. The curve of residual depletion of ABZ and its metabolites in patinga fillets adjusted to the quadratic model, but it was not possible to construct the residual depletion curve for tilapia. Withdraw period was estimated at three days for patinga.

Key words: albendazole; LC-MS/MS; aquaculture; residual depletion; withdraw period, QuEChERS.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da metabolização do ABZ.	23
Figura 2 e 3. Caixas de fibra com capacidade para 500 L de água contendo renovação de água e oxigenação complementar utilizadas nos experimentos.	50
Figura 4. Peixes eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico. Balde com solução de benzocaína e peixes da espécie patinga imersos.	50
Figura 5. Tilápia sendo pesada em balança analítica após eutanásia.	51
Figura 6. Exemplo de Cromatograma na amostra branco de filé (músculo e pele) fortificada na concentração de 100 ng g^{-1} com os analitos (ABZ, ABZSO, ABZSO ₂ , ABZ-2-NH ₂ SO ₂) e o PI (FNC). Separação realizada por gradiente de fase móvel (Acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico e Água acidificada com 0,1% de ácido fórmico).	54
Figura 7. Cromatogramas encontrados para cada analito em uma amostra fortificada a 10 ng g^{-1} em filé de peixe (músculo e pele).	59
Figura 8. Cromatogramas encontrados para cada analito em amostra branco de filé.	60
Figura 9. Curvas analíticas para todos os analitos em filé de tilápia. Eixo “x” = Concentração (ng g^{-1}) e eixo “y” = razão do sinal do analito e do sinal do padrão interno concentrações (eixo “x”) e a razão do sinal do analito e do sinal do padrão interno (eixo “y”).	63
Figura 10. Curvas analíticas para todos os analitos em filé de patinga. Eixo “x” = Concentração (ng g^{-1}) e eixo “y” = razão do sinal do analito e do sinal do padrão interno concentrações (eixo “x”) e a razão do sinal do analito e do sinal do padrão interno (eixo “y”).	64
Figura 11. Gráficos da distribuição de erros residuais na espécie de Tilápia. Eixo “x” = resíduos e Eixo “y” = Concentração (ng g^{-1}).	65
Figura 12. Gráficos da distribuição de erros residuais na espécie de patinga. Eixo “x” = resíduos e Eixo “y” = Concentração (ng g^{-1}).	66
Figura 13. Cromatograma característico de monitoramento do ABZ e do padrão interno em amostra branco de ração fortificada na concentração de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$	69
Figura 14. Cromatogramas obtidos da amostra branco de ração para FNC e ABZ.	70

Figura 15. Cromatogramas obtidos da amostra branco de ração fortificada com ABZ e PI ($800 \mu\text{g g}^{-1}$).	71
Figura 16. Curva analítica média obtida para o ABZ na ração.	72
Figura 17. Gráfico de distribuição de resíduos do ABZ na ração.	72
Figura 18. Curva de depleção residual considerando a soma dos resíduos marcadores do ABZ. LMR: Limite Máximo de Resíduo (100 ng g^{-1}).	81
Figura 19. Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual considerando a soma dos resíduos marcadores do ABZ. LMR: Limite Máximo de Resíduo ($\text{Ln}_{\text{LMR}} = 4,6$); (a): reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%.	82
Figura 20. Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual considerando a soma dos resíduos marcadores do ABZ. LMR: Limite Máximo de Resíduo ($\text{Ln}_{\text{LMR}} = 4,6$); (a): reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. LMRs definidos pelas principais agências regulatórias.....	24
Tabela 2. Composição nutricional da ração Nutripiscis (Purina®) de acordo com o fabricante.....	33
Tabela 3. Transições monitoradas para identificação e quantificação do ABZ e o padrão interno (FNC) na ração.....	39
Tabela 4. Critérios para aprovação dos parâmetros de precisão e exatidão conforme MAPA (2011).....	41
Tabela 5. Condições de monitoramento para o ABZ e seus metabólitos.	42
Tabela 6. Critérios para aprovação dos parâmetros de precisão e exatidão conforme o guia VICH G49 (2015).....	47
Tabela 7. Gradiente utilizado no método cromatográfico para a determinação dos analitos para as duas espécies de peixes (Busatto et al, 2017).....	53
Tabela 8. Propriedades físico-químicas do (A) ABZ, (B) ABZSO, (C) ABZSO ₂ , (D) ABZ-2-NH ₂ -SO ₂ , (E) FNC (PubChem).	54
Tabela 9. Eficiência de Extração para as espécies de tilápia e patinga, em porcentagem (%), para ABZ, ABZSO, ABZSO ₂ , ABZ-2-NH ₂ SO ₂ e FNC.	57
Tabela 10. Efeito matriz, em porcentagem (%), encontrado para os filés de tilápia.	61
Tabela 11. Efeito matriz, em porcentagem (%), encontrado para os filés de patinga.	61
Tabela 12. Valores obtidos para o teste de falta de ajuste (lack-of-fit).	65
Tabela 13. Intervalo aceitável para precisão e exatidão, segundo o guia VICH GL49.	66
Tabela 14. Resultados obtidos Precisão e Exatidão para todos os analitos.	67
Tabela 15. Resultados de LOD e LOQ para o ABZ e seus metabólitos.	68
Tabela 16. Efeito residual (%) encontrado para o ABZ e seus metabólitos e para o padrão interno.	68
Tabela 17. Resultados de precisão e exatidão para o ABZ na ração.	74
Tabela 18. Análise da ração preparada com o ABZ.	75
Tabela 19. Porcentagem de perda de ABZ em função do tempo.	76

Tabela 20. Resultado das concentrações dos resíduos marcadores encontradas no filé (músculo e pele) de patinga.....	78
Tabela 21. Resultados analíticos das amostras de filé (músculo + pele) de tilápia. .	84
Tabela 22. Trabalhos na literatura de estudos de depleção residual do ABZ e seus metabólitos.	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABZ	Albendazol
ABZ-2-NH ₂ SO ₂	Albendazol -2- aminosulfona
ABZSO	Albendazol sulfóxido
ABZSO ₂	Albendazol sulfona
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Trifosfato de Adenosina
CV	Coeficiente de Variação
CVMP	Comitê para Medicamentos para Uso Veterinário (<i>Committee for Medicinal Products for Veterinary Use</i>)
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva (<i>dispersive – Solid Phase Extraction</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EMA	Agência Européia de Medicamentos (<i>European Medicines Agency</i>)
ESI	Ionização por Eletronebulização (<i>Electrospray Ionization</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FDA	Agência dos Estados Unidos que trata de Alimentos e a Administração de Fármacos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FNC	Fenacetina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	Ingestão Diária Aceitável
JECFA	Comitê de Peritos da FAO/OMS em Aditivos para Alimentos (<i>Joint Food and Agricultural Organization Expert Committee on Food Additives</i>)

LC–MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LOAEL	Menor Nível Com Efeito Adverso Observado (<i>Lowest Observable-Adverse-Effect Level</i>)
LOD	Limite de Detecção (<i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de Quantificação (<i>Limit of Quantitation</i>)
MAPA	Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
MS	Espectrometria de Massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
NaCl	Cloreto de sódio
NOAEL	Nível Sem Efeitos Adversos (<i>No-Observable-Adverse-Effect</i>)
PI	Padrão Interno
PSA	Amina Primária e Secundária
QuEChERS	Rápido, Fácil, Efetivo, Robusto, Seguro (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>)
SPE	Extração em Fase Sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SRM	Monitoramento das Reações Seleccionadas (<i>Selected Reaction Monitoring</i>)
UE	União Europeia
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Uso de Medicamentos Veterinários <i>versus</i> Segurança do Alimento.....	19
1.2. Limite Máximo de Resíduos e Período de Carência	20
1.3. Anti-helmínticos: Albendazol	22
1.4 Métodos analíticos e preparo de amostras	25
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Material	31
3.1.1 Reagentes e solventes	31
3.1.2 Preparo das soluções padrão.....	31
3.1.3 Soluções de trabalho.....	32
3.1.4 Amostras branco de filé de peixe	32
3.1.5 Animais do ensaio de depleção.....	32
3.1.6 Ração comercial.....	33
3.1.7 Equipamentos e acessórios	34
3.2 MÉTODOS	35
3.2.1 Incorporação do albendazol na ração	35
3.2.2 Ensaio de lixiviação do albendazol da ração para a água.....	36
3.2.3 Método para determinação do ABZ na ração	37
3.2.4 Determinação do albendazol e seus metabólitos no filé de peixe	41
3.2.5 Ensaio de depleção residual do albendazol e seus metabólitos e estimativa do período de carência.....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1 Determinação do albendazol em filé de peixe	53

4.1.1 Configuração do sistema LC-MS/MS	53
4.1.2 Procedimento de preparo de amostra e extração	55
4.1.3 Avaliação do método de extração	56
4.1.4 Avaliação da confiabilidade do método analítico.....	57
4.2 Determinação do albendazol na ração.....	69
4.2.1 Método analítico empregando LC-MS/MS.....	69
4.2.2 Extração do albendazol na ração	69
4.2.3 Avaliação analítica do método para a ração.....	70
4.2.4 Avaliação do processo de incorporação do albendazol na ração.....	75
4.2.5 Ensaio de lixiviação	75
4.3. Resultado ensaio de depleção residual do albendazol	76
4.3.1 Avaliação dos resultados de depleção do albendazol e seus metabólitos em filés de patinga	77
4.3.2 Avaliação dos resultados de depleção do albendazol e seus metabólitos em filés de tilápia.....	84
4.3.3. Estudos de depleção residual do ABZ em peixes reportados na literatura.	86
5. Conclusões.....	92
6. Referências Bibliográficas	96
ANEXO I.....	104

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Uso de Medicamentos Veterinários *versus* Segurança do Alimento

O uso de produtos veterinários na produção de alimentos de origem animal é um recurso necessário a fim de assegurar a saúde animal. Porém, a administração indevida e imprópria dessas substâncias, como o desrespeito ao período de carência após o tratamento, pode levar à presença de resíduos dessas substâncias no leite, ovos e nos tecidos comestíveis (Know, Lehotay, & Geis-Asteggianti, 2012). Os resíduos podem remanescer no produto final na forma original ou, ainda, como subprodutos ou metabólitos, quando degradados ou biotransformados, respectivamente. A possibilidade da presença dessas substâncias no alimento representa um potencial risco à saúde do consumidor (Paschoal et al. 2008; FDA, 2011), pois tais resíduos podem estar diretamente relacionados a efeitos tóxicos, como reações alérgicas e resistência bacteriana quando consumidos pelos seres humanos (Ashley, 2007).

A aquicultura compreende a produção de organismos que possuem como principal *habitat* o meio aquático e desempenha um papel importante na produção global de alimentos, sendo os peixes a principal classe produzida, tanto em valor comercial quanto econômico (World Bank, 2013). Essa é uma atividade que está em contínua expansão, crescendo mais rápido que as demais criações de animais para alimentação humana. Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2018), entre os anos de 1961 e 2017, a média de crescimento anual do consumo de pescados no mundo (3,2 %) superou o crescimento populacional (1,6 %) e excedeu o consumo de carne de todos os animais terrestres combinados (2,8 %).

A maior parte do sistema de aquicultura no mundo baseia-se em métodos intensivos de cultivo, com o objetivo de melhorar a eficiência da produção de alimentos (Quesada et al. 2013). Ou seja, elevada densidade populacional e volume, o que pode fornecer um ambiente favorável para surtos de doenças infecciosas. Dessa forma, a aquicultura depende fortemente da disponibilidade de medicamentos veterinários, tanto para o uso metafilático (prevenção de doenças) quanto para uso terapêutico (tratamento de doenças) (Sapkota et al. 2008; JSA 2007). Porém, o uso

dessas substâncias vem sendo uma preocupação crescente para os consumidores nos últimos anos.

Até o presente, existem poucos produtos de uso veterinário regulamentados no Brasil para serem administrados às espécies aquícolas no controle de doenças infecciosas, que são os antimicrobianos florfenicol e a oxitetraciclina, uma formulação de ação antiparasitária de uso homeopático e um antiparasitário a base de triclorfon, além de uma vacina utilizada contra infecções estreptocócicas (*Streptococcus agalactiae*). Outros disponíveis constituem-se em produtos utilizados na desinfecção das instalações ou na conservação de matéria-prima e rações, empregadas nas alimentações de espécies aquícolas (FAO, 2010; Hashimoto et. Al., 2011 e 2012; SINDAN, 2016).

Devido à carência de medicamentos veterinários alternativos e ao alto custo dos medicamentos disponíveis, existe a suspeita de que os piscicultores estejam fazendo uso de prescrição irregular, ou mesmo de substâncias proibidas, como o verde de malaquita (FAO, 2014; Hashimoto et al. 2011), levando ao possível risco da presença de resíduos tóxicos dessas substâncias no pescado se tornando um risco aos consumidores.

1.2. Limite Máximo de Resíduos e Período de Carência

As agências FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura), a OMS (Organização Mundial da Saúde) e a OIE (Organização Internacional das Epizootias), em trabalho conjunto com os governos de diferentes países, têm focado atenção na questão do uso responsável dos medicamentos veterinários em todos os sistemas de produção animal.

Neste contexto, o estabelecimento e aplicação do Limite Máximo de Resíduo (LMR) para os fármacos utilizados na produção animal se faz indispensável. O LMR é definido como a concentração máxima aceitável de uma substância nos tecidos comestíveis de um animal (gordura, rins, fígado, músculos, mel, leite e ovos) que, sendo ingerida pelo ser humano, não representa risco para sua saúde. São estabelecidos LMR para todos os fármacos que tem seu uso aprovado em animais de produção, e são diferenciados entre as espécies animais e entre os tecidos dos

mesmos. A atenção aos LMR é de grande importância, com vista à garantia de que os alimentos que estão disponíveis no mercado sejam seguros para o consumo.

O órgão responsável na União Europeia pelo estabelecimento dos LMR para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal é o Grupo de Trabalho da Segurança de Resíduos (Working Group on the Safety of Residues – WGSR), pertencente ao Comitê de Produtos Veterinários Medicinais (Committee for Veterinary Medicinal Products – CVMP) da Agência Europeia de Medicamentos (European Medicines Agency – EMEA).

O Comitê de Peritos da FAO/WHO sobre Aditivos em Alimentos (JECFA), órgão que assessora o Codex Alimentarius, estabelece valores de LMR para fármacos veterinários utilizados na produção de alimentos de origem animal. As recomendações dadas pelo JECFA são adotadas pelo Codex Alimentarius, para garantir a segurança alimentar dos consumidores no mundo.

Para estabelecer medidas de vigilância sanitária, diferentes países adotam as recomendações do Codex Alimentarius.

Os regulamentos não só autorizam os tipos de medicamentos que podem ser utilizados, como também especificam a espécie a que se destinam, o diagnóstico, a dose e a duração do tratamento, bem como, o período de interrupção (Período de Carência) que deve ser observado entre a última administração do fármaco e o abate ou coleta de leite, ovos e mel, quando o fármaco é utilizado como agente terapêutico. O cumprimento destas condições e regulamentos assegura que os resíduos estejam abaixo dos LMR estabelecidos.

O Brasil, como membro do Codex Alimentarius, também adota valores de LMR para fármacos utilizados na produção de alimentos de origem animal.

Em peixes, a problemática em se estabelecer o período de carência ou extrapolá-lo para as demais espécies consiste no fato de que o metabolismo animal e a consequente eliminação dos fármacos são altamente dependente da temperatura da água no sistema de criação, como exemplo, peixes que vivem em baixas temperaturas o período de carência é maior que para aqueles que vivem em ambientes com temperaturas maiores (Rigos et al 2002). Ainda, a eliminação

metabólica pode ser influenciada por outros fatores como a salinidade da água (Feng et al. 2008) e o teor de lipídeos na composição corporal do animal. Tem-se, portanto, a necessidade de estabelecer o período de carência apropriado para cada fármaco e para cada espécie de peixe envolvida, visando contribuir com as boas práticas veterinárias de uso e a segurança do consumidor (Reimschuessel et al. 2015).

1.3. Anti-helmínticos: Albendazol

Dentre as principais doenças que afetam os peixes, as parasitoses constituem cerca de 83% das enfermidades (Onaka & Moraes 2008), gerando perdas significativas na produção. Os principais agentes causadores de mortalidades em espécies de peixes comerciais são do grupo dos ectoparasitas monogenéticos e helmintos nematoides. Por isso a importância em garantir a saúde dos animais, através da utilização de medicamentos antiparasitários/anti-helmínticos na piscicultura (Silva et al., 2017).

Os benzimidazóis são amplamente utilizados para o tratamento de infecções parasitárias gastrintestinais em animais, incluindo os peixes (Bistoletti, Moreno, Alvarez, & Lanusse, 2011; Hakalahti, Lankinen, & Valtonen, 2004). Um importante membro da família dos benzimidazóis é o Albendazol (ABZ), um potente anti-helmíntico de amplo espectro, considerado um fármaco alternativo contra parasitas em animais aquáticos, já utilizado para tratar parasitas de peixes como microsporídios e infestação por *Eubothrium crissum* (Delaunay, P. & Parish R., 1986; McKellar & Scott, 1990; Chagas et al. 2016).

Porém, o uso desautorizado ou incorreto desses fármacos pode resultar na presença de resíduos desses compostos no alimento final, o que pode causar consequências aos consumidores.

Dada a carência de alternativas antiparasitárias devidamente regulamentadas para a aquicultura, verifica-se, portanto, uma grande necessidade de estudos voltados à essa demanda para contribuir com a expansão da piscicultura no Brasil. Neste contexto, destacamos o albendazol (ABZ) como potencial fármaco para uso na aquicultura.

O ABZ age inibindo a formação dos microtúbulos e bloqueia a captação de glicose dos vermes, resultando na depleção de glicogênio e formação de trifosfato de adenosina (ATP), necessários para a sobrevivência destes. Trata-se de um fármaco com amplo espectro de ação e já muito usado em bovinos, ovinos e caprinos (Korolkovas & França, 2009; Spinosa, 2011).

Alguns estudos de depleção residual do ABZ e seus metabólitos para determinação do período de carência têm sido realizados em algumas espécies de peixes, como o salmão, a truta arco-íris, tilápia e pacu (Shaikh et al. 2006; Evans et al. 2011; Busatto et al. 2016), o que evidencia o interesse em avaliar este princípio ativo como alternativa de fármaco.

O ABZ, após a administração oral, é absorvido no trato gastrointestinal e metabolizado (Shaikh et al. 2006; Dayan et al, 2003). Vários metabólitos são formados na biotransformação, como o ABZ sulfóxido (ABZ-SO), ABZ sulfona (ABZ-SO₂) e ABZ-aminosulfona (ABZ-2-NH₂SO₂). Seu metabólito farmacologicamente ativo, o ABZ-SO (Shaikh et al. 2006; Zhang, et. al., 2011) é considerado responsável pela ação farmacológica do ABZ, sendo este oxidado e convertido em ABZ-SO₂, farmacologicamente inativo. O grupo carbamato do ABZ-SO₂ é então desacetilado para formar o último metabólito, o ABZ-2- NH₂SO₂, também farmacologicamente inativo. Um esquema da metabolização do ABZ é mostrado na Figura 1. Poucos estudos foram feitos sobre o metabolismo e depleção do ABZ e seus metabólitos nas diversas espécies de peixes (Shaikh et al., 2006).

Figura 1. Esquema da metabolização do ABZ.

Devido aos potenciais efeitos colaterais embriotóxicos e teratogênicos do ABZ e ABZSO relatados em uma variedade de espécies animais, os níveis de resíduos requerem monitoramento cuidadoso em produtos de origem animal (Carlsson, 2011). As agências reguladoras de medicamentos veterinários não estão harmonizadas em relação ao resíduo marcador (resíduo cuja concentração está em uma relação conhecida com a concentração de resíduo total em um tecido comestível) e ao LMR adotado para monitorar o uso do ABZ na produção de animais (Zhang et al. 2011, Busatto 2016, Busatto et al 2017). O *Codex* estabelece um LMR de 100 ng g⁻¹ para o resíduo marcador ABZ-2-NH₂SO₂ na matriz muscular, porém não especifica a espécie (CODEX, 1993). A EMA estabelece valores de LMR para bovinos, caprinos e ovinos que variam de 100 ng g⁻¹ (músculo, gordura e leite) a 1000 ng g⁻¹ (fígado), o resíduo marcador é obtido pela soma de todos os três metabólitos (ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂) (EMA, 2008). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no Brasil, definiu para o ABZ um LMR de 100 ng g⁻¹ em músculo de bovino e suíno, porém o resíduo marcador não é especificado (Brasil, 2014). Veja tabela 1.

Tabela 1. LMRs definidos pelas principais agências regulatórias.

Agência Regulatória	Fármaco	Resíduo marcador	Espécie	LMR (ng g ⁻¹)	Tecidos Alvos
<i>Codex Alimentarius</i>	Albendazol	ABZ-2-NH ₂ -SO ₂	n.d	100	Músculo
<i>European Medicines Agency</i>	Albendazol	Soma	Bovinos, ovinos	100	Músculo
		ABZSO,		100	Gordura
		ABZSO ₂ ,		1000	Fígado
		ABZ-2-		500	Rim
		NH ₂ -SO ₂		100	Leite
MAPA	Albendazol	ABZ	Bovino e suíno	100	Músculo

Como o ABZ ainda não está aprovado para a indústria aquícola, a caracterização detalhada do comportamento cinético, do destino metabólico e do perfil residual do fármaco após administração oral em pescados contribuirá para o seu uso otimizado nestas espécies.

Diante do cenário constituído pela reconhecida demanda por medicamentos para a aquicultura e a falta de alternativas desses produtos devidamente regulamentados, o presente trabalho visou realizar um estudo de depleção residual do ABZ e seus metabólitos considerados mais importantes em duas espécies de peixes de importância comercial no Brasil, a tilápia e a patinga, com o objetivo de avaliar e comparar os resultados obtidos para ambas as espécies quanto ao perfil de eliminação dos resíduos, estimar os respectivos períodos de carência mínimos a serem recomendados tomando-se como base o LMR de 100 ng g^{-1} e, como resíduo marcador, a soma do fármaco original e seus três metabólitos.

Além da tilápia e patinga serem de importância econômica para o Brasil, elas possuem diferenças na composição corpórea de lipídeos, o que poderia afetar o comportamento de depleção residual dessas substâncias. A tilápia é considerada um peixe magro que possui aproximadamente 2% de gordura corporal, já a patinga é da família de peixes redondos e pode chegar a mais de 10% de gordura (Leonhardt et al 2006; Arbeláez-Rojas et al 2002). É sabido que o conteúdo de lipídeos é um fator importante na distribuição de metabólitos, portanto faz-se necessário avaliar a diferença da depuração nas espécies com diferentes teores de lipídeos (Jiang et al., 2009).

1.4 Métodos analíticos e preparo de amostras

Para garantir a segurança alimentar, métodos analíticos sensíveis e específicos são necessários para determinar medicamentos veterinários em matrizes alimentares. Algumas técnicas analíticas, tais como ensaio microbiológico, enzimático ou procedimentos imunoquímicos, como ensaio imunoenzimático (ELISA) (Kinsella et al., 2009; Matabaro, Ishimwe, Uwimbabazi, & Lee, 2017), têm sido utilizados, já que são métodos simples e de menor custo. No entanto, apresentam

pouca seletividade e não são capazes de diferenciar entre vários tipos de compostos, fornecendo apenas medidas semiquantitativas.

A espectrometria de massas (MS) foi selecionada como a técnica mais adequada para detecção de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, de acordo com agências de Saúde Pública de muitos países, pois fornece uma identificação inequívoca e uma confirmação confiável, além de reduzir interferências cromatográficas (Lopes, Reyes, Romero-González, Vidal, & Frenich, 2012). Assim, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada à espectrometria de massas em tandem (*MS/MS*) tornou-se a técnica predominante para monitoramento de resíduos químicos em alimentos de origem animal, uma vez que esta técnica requer simples pré-tratamento da amostra.

A complexidade de certas matrizes, como os alimentos de origem animal, pode causar problemas na eficiência de ionização, detecção e no número de interferentes presentes na matriz, os quais variam muito dependendo do alimento (Ferrer, Malato, & Agüera, 2013).

Assim, a preparação da amostra também é um passo crítico para os métodos analíticos. Diversos procedimentos tais como extração líquido-líquido, extração com fluido supercrítico e extração líquido-líquido com partição rápida a temperaturas muito baixas, têm sido utilizados para melhorar a extração de resíduos de medicamentos veterinários.

O procedimento QuEChERS (acrônimo de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) apresenta grande número de vantagens, pois constitui um procedimento rápido e barato que requer poucas etapas e minimiza o tempo necessário para concluir a extração e limpeza do extrato, como reduzir o tamanho da amostra e as quantidades de materiais utilizados no laboratório (Prestes, Adaime, & Zanella, 2011).

QuEChERS é a metodologia mais utilizada para a análise de um amplo espectro de analitos com diferentes propriedades físico-químicas, utilizando uma etapa de limpeza adicional baseada na extração em fase sólida dispersiva (d-SPE). Este tipo de técnica apresenta algumas vantagens em relação à SPE tradicional, como a utilização de menor quantidade de sorvente e solvente, todo o sorvente

interage igualmente com o extrato da matriz (Wilkowska, Biziuk 2011; Bruzzoniti et al. 2014; Zanella, 2015) e remove a água residual de forma simultânea com a limpeza do extrato.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal a realização de estudos de depleção residual do ABZ e seus principais metabólitos em duas espécies de peixe, a tilápia e a patinga, para estimativa dos períodos de carência.

Para tal, realizaram-se as seguintes etapas:

- 1) Estudo do procedimento para incorporar o ABZ na ração a ser administrada aos peixes;
- 2) Avaliação da uniformidade de incorporação do ABZ na ração e eventuais perdas durante o processo;
- 3) Avaliação do risco de lixiviação do ABZ da ração para a água;
- 4) Estabelecimento e avaliação das condições a comporem o método analítico empregando LC-MS/MS para determinação de ABZ na ração;
- 5) Otimização das condições de preparo das amostras de extração do ABZ e seus metabólitos em filé de peixe;
- 6) Estabelecimento e avaliação do método analítico empregando LC-MS/MS para a determinação de resíduos de ABZ e seus principais metabólitos em filé de peixe (músculo e pele em proporções naturais);
- 7) Planejamento e realização do estudo experimental de depleção residual a partir do tratamento com a ração medicada contendo ABZ;
- 8) Abate dos animais tratados em diferentes períodos e coleta dos filés (músculo e pele em proporções naturais);
- 9) Análise das amostras provenientes do estudo de depleção residual empregando o método analítico estabelecido;
- 10) Análise estatística dos resultados, com o propósito de se estimar os períodos de carência a serem recomendados para ABZ com base nos LMRs estabelecidos;
- 11) Avaliação e discussão dos perfis de depleção residual obtidos para as duas espécies de peixes envolvidas.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Reagentes e solventes

Acetonitrila (ACN: J. T. Baker, México) e ácido fórmico grau HPLC (J. T. Baker, México) foram utilizados para o preparo da fase móvel para análise cromatográfica. ACN, Metanol (J. T. Baker, México) e os sais, sulfato de magnésio anidro (MgSO_4 : Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e cloreto de sódio (NaCl: Synth, Diadema, Brasil), foram utilizados para as etapas de extração. A amina primária-secundária (PSA), utilizada para a etapa de limpeza do extrato, foi a da marca Agilent Technologies (Estados Unidos). A água utilizada para preparo de soluções e fase móvel foi purificada pelo sistema Milli-Q 3 UV System (Millipore, Alemanha). Para o abate dos animais do estudo de depleção, benzocaína (>98% Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi utilizada.

Os padrões analíticos usados nesse estudo foram: albendazol (ABZ: 98%, Fluka Analytical – sigma-Aldrich, China), albendazol sulfóxido (ABZSO: 99,9%, Fluka Analytical – Sigma-Aldrich, China), albendazol sulfona (ABZSO₂: 99,6%, Fluka Analytical – Sigma-Aldrich, China), albendazol-2-aminosulfona (ABZ-2-NH₂SO₂: 99,6%, Fluka Analytical – Sigma Aldrich, China) e fenacetina (FNC: 98%, Aldrich Chemistry – Sigma-Aldrich, China).

3.1.2 Preparo das soluções padrão

Soluções estoque individuais de ABZ, ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂ foram preparadas dissolvendo os padrões analíticos em metanol na concentração de 0,1 mg mL⁻¹. A solução estoque de FNC (padrão interno) foi preparada dissolvendo o reagente em metanol na concentração de 1,0 mg mL⁻¹. Devido à baixa solubilidade do ABZ e seus metabólitos em metanol, quantidades adequadas de ácido fórmico foram utilizadas para auxiliar na solubilização.

Todas as soluções estoques foram armazenadas em frasco âmbar, devidamente vedados, e mantidas em freezer à -20 °C por 6 meses.

3.1.3 Soluções de trabalho

As soluções de trabalho utilizadas no desenvolvimento dos métodos analíticos foram preparadas diariamente nas concentrações de 10 e 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ em metanol. A partir destas soluções foram realizadas as diluições para o preparo da curva em solução e fortificação das amostras branco visando o preparo da curva em matriz, composta pelas concentrações de 10, 50, 100, 150 e 200 ng g^{-1} .

A solução de metabissulfito de sódio, utilizada no início do método de extração do ABZ e seus metabólitos no filé de peixe, foi preparada diariamente na concentração de 8 mg mL^{-1} , através da solubilização do metabissulfito de sódio em água destilada.

3.1.4 Amostras branco de filé de peixe

As amostras branco de filé dos peixes utilizadas no desenvolvimento do método analítico foram adquiridas no mercado municipal de Ribeirão Preto, São Paulo. Os filés (músculo e pele, em proporções naturais) de tilápia e patinga foram triturados e homogeneizados com auxílio de um processador de alimentos e armazenadas em freezer (-20°C). Essas amostras foram previamente analisadas a partir do método analítico desenvolvido para fins de verificação da eventual presença residual dos analitos. As amostras só foram consideradas branco após confirmada a não detecção dos analitos nas mesmas, considerados os limites do método.

3.1.5 Animais do ensaio de depleção

Os guias VICH/GL49 e VICH/GL57 (*“Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing species: marker residue depletion studies to establish product withdrawal periods in aquatic species”*, 2018) foram tomados como referência para delinear o ensaio experimental. Cento e vinte tilápias (*Oreochromis niloticus*) (155 ± 39 g) e 120 patingas (híbrida do *Piaractus mesopotamicus* x *P. brachypomus*) (65 ± 16 g) foram armazenadas em tanques plásticos de 0,5 m^3 com aeração constante e vazão de água livre (200 L h^{-1}),

realizada no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia dos Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da UNESP (Caunesp, Jaboticabal, SP).

Os animais foram climatizados nas condições do ambiente por 50 dias com alimentação por ração comercial (Nutripiscis SI Crescimento, Purina®). O grupo controle (n=20) recebeu ração comercial livre de ABZ. Os parâmetros físico-químicos da água no sistema foram monitorados três vezes por semana, os valores médios registrados foram: $30,0 \pm 0,5$ °C, pH $8,3 \pm 0,1$ e nível de oxigênio dissolvido de $6,9 \pm 0,1$ mg/L. A concentração total de amônio foi sempre menor que 0,5 mg/L. Todos os parâmetros foram apropriados para manutenção e bem-estar dos peixes.

Os animais foram adquiridos com produtores locais da região de Ribeirão Preto/SP. Na época, não havia disponíveis peixes na idade adulta ou com maior massa corpórea, e não houve tempo hábil para esperar a engorda e o crescimento dos peixes, por isso os animais foram tratados e abatidos enquanto jovens.

3.1.6 Ração comercial

A ração utilizada para alimentação e tratamento dos peixes do estudo de depleção foi da marca Purina®, Nutripiscis SI Crescimento 28% (ração extrusada de 6/8 mm de diâmetro,). Sua composição nutricional pode ser verificada na Tabela 2.

Tabela 2. Composição nutricional da ração Nutripiscis (Purina®) de acordo com o fabricante.

Ração Nutripiscis (Purina®)	
Umidade (máxima)	100 g Kg ⁻¹
Proteína Bruta (mínima)	280 g Kg ⁻¹
Extrato Étere (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

3.1.7 Equipamentos e acessórios

Para a pesagem dos padrões analíticos, utilizou-se uma balança analítica da marca Shimadzu AUW220D (Shimadzu, Quioto, Japão). Para pesagem da carne de peixe e dos sais utilizados no método de extração do tipo QuEChERS foi utilizada uma balança semi-analítica do modelo Marte AL 200C (Marte Científica, São Paulo, Brasil).

Para a trituração e homogeneização da matriz branco (músculo e pele em proporções naturais) foi empregado um processador de alimentos (Philco, Santa Catarina, Brasil). Para as amostras do estudo de depleção, devido às pequenas quantidades, foi utilizado um moinho (IKA ® A 11 basic, USA) para a homogeneização. Para as etapas de extração, foram utilizados um agitador de tubo tipo *vortex* modelo AP56 (Phoenix, São Paulo, Brasil), uma centrífuga refrigerada Himac CF5RX (Hitashi, Tóquio, Japão), um agitador horizontal modelo PA2479 (Pachane, São Paulo, Brasil) e um banho de ultrassom Maxiclean modelo USC-1450 (Unique, São Paulo, Brasil).

As análises cromatográficas foram realizadas empregando-se um sistema configurado com um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Quioto, Japão) constituído por duas bombas modelo LC10AD, um sistema controlador modelo SLC10A, um forno modelo CTO10AS e um injetor automático modelo SIL20A. O sistema cromatográfico é acoplado a um espectrômetro de massas em série (LC-MS/MS), composto por analisadores de massas do tipo triplo-quadrupolo (Quattro LC, Micromass, Manchester, UK) com uma interface de eletronebulização, operando no modo positivo (*ESI+*). A coluna XTerra C₁₈ foi utilizada para a separação cromatográfica e mantida a 25 °C. Após o procedimento de extração e antecedendo a injeção cromatográfica, os extratos foram filtrados em membrana regenerada de celulose (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha) com 0,2 µm de tamanho de poro e 25 mm de diâmetro.

As temperaturas da fonte de ionização e do gás de dessolvatação empregadas foram mantidas em 100°C e 350°C, respectivamente. O gás nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e secagem sob vazões de 40 e 380 L h⁻¹, respectivamente. A diferença de potencial do capilar foi definida como 3 kV. O gás

argônio foi empregado na câmara de colisão sob pressão de $2,15 \times 10^{-3}$ mbar. A aquisição e processamento dos dados foram efetuados através do software Micromass MassLynx versão 4.1.

Para o procedimento de incorporação do ABZ à ração, utilizou-se um agitador magnético com aquecimento modelo 752A (Fisatom, São Paulo, Brasil). Para o ensaio de lixiviação do ABZ incorporado a ração, foi utilizado um banho metabólito com sistema de aquecimento e agitação, tipo dubnoff (Marconi, São Paulo, Brasil) e um pHmetro Orion modelo 420A+ (Thermo Electron Corporation, EUA).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Incorporação do albendazol na ração

Foi desenvolvido um método de incorporação do antiparasitário na ração comercial para peixes, a qual foi empregada como veículo de administração do fármaco aos peixes utilizados no estudo de depleção residual.

O método desenvolvido para incorporar o ABZ na ração consistiu em adicionar à ração uma suspensão contendo o fármaco em solução de gelatina a 5% (m/m). Este método tomou como referência o princípio de incorporação de um medicamento já regulamentado e utilizado na aquicultura em países como os EUA, o Romet[®]30 (sulfadimetoxina e ormetroprim) (Pharmaq, 2014).

A solução de gelatina a 5 % (m/m) foi preparada dissolvendo-se gelatina sem sabor em uma mistura de água e álcool etílico 96 °GL (1:1 v/v), sob agitação constante em chapa aquecedora a 50 °C. Em seguida, após o resfriamento da solução, para cada 1 mL de solução, foram adicionados 25 mg de ABZ, mantendo-se a agitação.

Para 250 g de ração, adicionaram-se 10 mL da suspensão com o fármaco. A agitação foi realizada manualmente, por aproximadamente 5 minutos, para garantir a homogeneidade. Aguardou-se 24 h para a evaporação dos solventes e secagem da ração.

3.2.2 Ensaio de lixiviação do albendazol da ração para a água

A eventual perda do fármaco incorporado à ração por lixiviação para a água foi avaliada por método de dissolução, com o auxílio do 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 béqueres contendo 900 mL de água. Em seguida, os béqueres foram submetidos à agitação branda. A temperatura e o pH da água foram monitorados e mantidos em $25,0 \pm 1,5$ °C e $7,4 \pm 0,6$, respectivamente. O ensaio de lixiviação foi realizado em triplicata.

O monitoramento da perda do fármaco para a água foi realizado em 4 períodos: 5, 15, 30 e 60 minutos. Em cada tempo foram coletadas alíquotas de 10 mL do meio aquoso, efetuando-se imediatamente a reposição do mesmo volume de água (10 mL). Em seguida, as alíquotas foram filtradas com o auxílio de um filtro de membrana de celulose regenerada com porosidade de 0,20 µm de diâmetro. O filtrado foi transferido para um vial e 5 µL foram injetados no sistema LC-MS/MS.

A solubilidade do ABZ na água é muito baixa ($22,8 \mu\text{g mL}^{-1}$, fonte: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00518>). No entanto, esse fato não foi comprometedor para o monitoramento do ABZ nas condições do experimento de lixiviação, uma vez que foi utilizado 1 g de ração contendo até 1 mg de ABZ (se desprezarmos possíveis perdas na etapa de incorporação) em um béquer com 900 mL de água. Na pior das hipóteses, se todo o teor de ABZ fosse lixiviado para a água, teríamos uma concentração máxima de ABZ em água de $1,11 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que seria significativamente menor do que a concentração crítica de solubilidade ABZ em água.

Para a determinação da presença de ABZ na água, utilizou-se para a quantificação a curva analítica do analito em água composta pelas concentrações: 0,5; 2; 10; 50; e 100 ng mL⁻¹ ($r > 0,99$).

3.2.3 Método para determinação do ABZ na ração

3.2.3.1 Método de extração

O método de extração do ABZ da ração tomou como referência o método desenvolvido por Busatto et al. (2017). À quantidade de 1 g de ração triturada foram adicionados 2 mL da solução extratora, composta por solução aquosa de ácido fórmico a 1%. A mistura foi levada à agitação por *vortex* durante 30 segundos e, posteriormente, ao banho ultrassom por 5 minutos. Em seguida, adicionaram-se 8 mL de MeOH, e a mistura foi homogeneizada em mesa agitadora por 15 minutos. Procedeu-se a centrifugação a 3500 rpm por 25 minutos. Foram coletados 500 µL do sobrenadante e transferidos para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%. A mistura final foi filtrada através de membrana de celulose regenerada (0,20 µm de diâmetro) e transferida para o vial de HPLC. Um volume de 5 µL foi injetado no sistema LC-MS/MS. Um esquema do procedimento de extração é representado a seguir.

Esquema 1. Representação do procedimento de extração do ABZ na ração.

Para a avaliação do procedimento de extração, foi estudada a eficiência de extração para o ABZ. Para tal, fez-se a fortificação da ração branco com o fármaco, em concentrações conhecidas. A amostra foi deixada em repouso por 30 minutos antes do início do processo de extração, com o intuito de assegurar a adsorção do analito a matriz. Todos os testes foram realizados em triplicata, sendo os resultados expressos como porcentagem do valor esperado.

3.2.3.2 Condições do sistema LC-MS/MS

A separação cromatográfica, fazendo uso da FNC como PI, foi realizada por fase móvel A consistindo em solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (v/v) e fase móvel B de ACN contendo 0,1 % de ácido fórmico (40:60 v/v); e como fase

estacionária foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa X-Terra C18 MS (3,9 mm x 100 mm x 3,5 μ m, Waters, EUA). Essa condição foi escolhida por ter alcançado resultados satisfatórios nos estudos realizados por Busatto et al. (2017). O tempo total da corrida cromatográfica foi de 9 minutos, sob eluição isocrática e vazão das fases móveis de 0,3 mL min⁻¹. A temperatura do forno da coluna analítica foi mantida a 25 °C. O volume de injeção foi de 5 μ L.

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, a interface entre o sistema cromatográfico e o de espectrometria de massas foi realizada pela fonte de ionização por eletronebulização, operando em modo positivo (ESI+). As transições monitoradas estão descritas da tabela 3.

Tabela 3. Transições monitoradas para identificação e quantificação do ABZ e o padrão interno (FNC) na ração.

Composto	Tempo de retenção (min)	Transição de quantificação (m/z)	Voltagem do cone	Transição de identificação (m/z)	Energia de colisão	Modo de ionização
ABZ	6,70 $\pm$ 0,86	266 > 234	20	266 > 191	20	ESI+
FNC (PI)	6,50 $\pm$ 1,05	180 > 110	20		20	ESI+

3.2.3.3 Avaliação do método analítico

A confiabilidade do método analítico desenvolvido para a ração foi avaliada baseada nos procedimentos descritos pelo 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). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, seletividade, precisão e exatidão (recuperação, %). Deve-se ressaltar

que o número de replicatas empregado nas avaliações dos parâmetros foi reduzido em relação às recomendadas pelo guia, já que o método desenvolvido se restringirá às análises das amostras provenientes nos estudos desta dissertação.

A seletividade do método desenvolvido foi avaliada de duas formas. Primeiro, pela comparação dos cromatogramas obtidos para a amostra branco e a amostra branco fortificada com o ABZ e o PI, verificando eventual interferentes na matriz. 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 equivalentes às da curva em solução (400, 600, 800, 1000 e 1200 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Os resultados de efeito matriz foram obtidos a partir da quantificação do extrato fortificado nos níveis citados, através do emprego da equação da reta obtida na curva analítica dos analitos em solução, e expressos em porcentagem do valor esperado subtraídos de 100%. O efeito matriz foi realizado em triplicata ($n=3$).

A linearidade foi avaliada pela curva analítica na matriz, através da fortificação de amostras branco de ração em cinco níveis de concentração: 400, 600, 800, 1000 e 1200 $\mu\text{g g}^{-1}$. A curva analítica para o ABZ foi obtida pela plotagem do fator de resposta (área do pico do analito / área do pico do padrão interno) em função da concentração do analito. Esse parâmetro foi expresso pelo coeficiente de regressão linear (r) da curva analítica, sendo também avaliado a distribuição dos erros residuais para cada nível de concentração avaliado.

A precisão e exatidão intradia foram realizadas pela fortificação das amostras branco de ração em três níveis de concentração (400, 800 e 1200 $\mu\text{g g}^{-1}$), utilizando três repetições para cada nível de concentração em 1 dia ($n=3$). Para avaliação da precisão e exatidão interdias, os mesmos níveis de concentração foram estudados, porém, em três dias diferentes ($n=3$). As análises foram realizadas pelo mesmo analista, mesmo equipamento, os resultados de precisão foram expressos pelo coeficiente de variação (CV, %). A exatidão foi avaliada por teste de recuperação (%), os resultados foram calculados como porcentagens obtidas das concentrações dos analitos empregados na fortificação.

Os critérios de aprovação quanto aos parâmetros de precisão e exatidão segundo o guia do MAPA (2011) podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4. Critérios para aprovação dos parâmetros de precisão e exatidão conforme MAPA (2011).

Concentração (C, mg Kg ⁻¹)	Coeficiente de Variação (%)	Faixa de Aceitação Fator de Recuperação (%)
100 ≤ C < 1000	15	95 a 105
1000 ≤ C < 10000	10	97 a 103

3.2.4 Determinação do albendazol e seus metabólitos no filé de peixe

3.2.4.1 Método analítico em filé de peixe

3.2.4.1.1 Configuração do sistema LC-MS/MS

Para o desenvolvimento do método voltado à quantificação do ABZ e seus metabólitos, foi empregada a FNC como padrão interno (PI). A coluna analítica utilizada para a separação cromatográfica foi a X-Terra C₁₈ MS (3,9 µm x 100 mm x 3,5 µm, Waters, EUA) e uma coluna guarda X-Terra C₁₈ MS (3,9 µm x 20 mm x 5 µm, Waters, EUA). A fase móvel foi constituída por solução de ACN acidificada com 0.1% de ácido fórmico e uma solução aquosa de ácido fórmico a 0.1% sob eluição por gradiente. A vazão da fase móvel foi de 0,3 mL min⁻¹. O forno da coluna analítica foi mantido a uma temperatura de 25°C por todo o tempo de análise.

Os analitos foram detectados no modo de Monitoramento de Reações Seleccionadas (MRS) das moléculas protonadas [M+H]⁺ e seus respectivos fragmentos. Através da infusão direta (20 µL min⁻¹) de soluções contendo os analitos (5 µg mL⁻¹) no espectrômetro de massas, foram escolhidas as melhores transições de fragmentação iônica (*m/z*) para o monitoramento de cada analito, de acordo com os íons-produtos gerados com maior intensidade. A diferença de potencial no cone foi definida em 20 V. A energia de colisão foi estabelecida em 20 eV para todos os analitos. As transições monitoradas para quantificação e identificação de todos os analitos são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5. Condições de monitoramento para o ABZ e seus metabólitos.

Analito	Tempo de retenção (min)	Transição de quantificação (m/z)	Transição de identificação (m/z)	Diferença de Potencial (V)	Energia de Colisão (eV)
ABZ	6,70 ± 0,86	266 > 234	266 > 191	20	20
ABZSO	8,10 ± 1,05	282 > 240	282 > 208	20	20
ABZSO ₂	8,93 ± 0,52	298 > 266	298 > 224	20	20
ABZ-2-NH ₂ SO ₂	7,45 ± 0,12	240 > 133	240 > 198	20	20
FNC	9,52 ± 0,48	180 > 110		20	20

3.2.4.2 Procedimento de preparo de amostra e extração

Inicialmente, os filés de peixe (músculo e pele em proporções naturais) foram triturados e homogeneizados com o auxílio de um processador de alimentos até obter uma massa homogênea. Essa massa foi então alíquotada em tubo falcon de 50 mL (5,0 ± 0,1 g) e mantida em freezer (-20 °C) até o momento do processo de extração.

O método de extração foi baseado no procedimento QuEChERS. Para tanto, nos tubos falcons com os filés homogeneizados já pesados, adicionou-se 300 µL de uma solução de metabissulfito de sódio (8 mg mL⁻¹) e 5 mL de ACN como solução extratora, sendo a mistura levada à agitação por 1 minuto em *vortex* e, posteriormente, ao banho de ultrassom por 10 minutos para auxiliar o processo de extração. Em seguida, para a etapa de partição, adicionaram-se 2 g de MgSO₄ anidro e 0,5 g de NaCl. A mistura foi levada à agitação por *vortex* durante 1 minuto e, então, centrifugada a 4 °C e 3500 rpm por 10 minutos. Após a etapa de centrifugação, iniciou-se a etapa de limpeza do extrato, onde foram coletados 3 mL do sobrenadante extraído e transferidos para um tubo de polipropileno de 15 mL contendo 450 mg de MgSO₄ e 25 mg de PSA. Essa mistura foi agitada por 30 segundos em *vórtex* e centrifugado a 4 °C e 3500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante formado nessa etapa foi filtrado com auxílio de uma seringa e filtro de membrana de celulose regenerada, com porosidade de 0,20 µm de diâmetro, e o

filtrado foi transferido para um vial, a partir do qual um volume de 5 μL foi injetado no sistema LC-MS/MS. Veja o método de extração esquematizado em Esquema 2.

Para avaliar o procedimento de extração, foram analisadas as eficiências de extração obtida para ABZ, ABZSO, ABZSO₂, ABZ-2-NH₂SO₂ e FNC.

Para tal, fez-se a fortificação da matriz branco de filé com os analitos e o PI em concentrações conhecidas. A amostra foi deixada em repouso por 15 minutos e ao abrigo de luz, visando permitir maior interação dos analitos com os constituintes da amostra branco antes de se iniciar o processo de extração.

O extrato fortificado consistiu na adição dos padrões em concentrações conhecidas após o procedimento de extração na matriz branco e antes da análise no LC-MS/MS.

As fortificações, tanto na matriz quanto no extrato, foram realizadas de forma a se obter para todos os analitos, as concentrações equivalentes a 10, 50, 100, 150, 200 ng g^{-1} .

A eficiência de extração foi obtida a partir da relação em porcentagem da área do pico obtida na matriz fortificada e a área do pico obtida no extrato fortificado para o mesmo nível de concentração de cada analito.

Esquema 2. Método de extração do ABZ e metabólitos em filés de peixe.

3.2.4.3 Avaliação da confiabilidade analítica do método desenvolvido

Para avaliar a capacidade e o desempenho analítico do método desenvolvido, realizou-se a avaliação da confiabilidade analítica do método, tomando como base

as recomendações do guia VICH GL49 (“*Studies to evaluate the metabolism and residues kinetics of veterinary drugs in human food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies*”), o qual é direcionado a métodos analíticos empregados em estudos de depleção residual de produtos veterinários em animais destinados ao consumo (VICH GL49, 2015).

Os parâmetros avaliados para as duas matrizes (filés de tilápia e filés de patinga) foram: linearidade, seletividade, precisão e exatidão intradia e interdia, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ).

Linearidade: as respectivas curvas analíticas para quantificação do ABZ e cada um de seus metabólitos foram elaboradas fortificando-se amostras branco de filé em cinco níveis de concentração: 10, 50, 100, 150, 200 ng g⁻¹ (0,1xLMR, 0,5xLMR, LMR, 1,5xLMR, 2xLMR), com o PI (FNC) mantido na concentração de 100 ng g⁻¹ em todos os níveis das curvas. A linearidade foi expressa pelo coeficiente de regressão linear (r) da curva.

Ademais, o manual do MAPA (2011) recomenda a avaliação da qualidade do ajuste e verificação da homoscedasticidade ou heterocedasticidade da resposta instrumental na regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados. Há homoscedasticidade quando a variável de resposta (sinal analítico, “y”) possui erros residuais distribuídos sem apresentar tendência, com desvios-padrão constantes. Dessa forma, avalia-se a necessidade ou não de ponderação na regressão. Assim, plotou-se um gráfico de dispersão dos erros residuais da regressão (eixo “y”) em função da concentração (eixo “x”) para avaliar a qualidade do ajuste.

A falta de ajuste (*Lack-of-Fit*) também foi determinada a partir do teste de *Cochran*, para avaliar se existe algum valor anormal nos resíduos e verificar o ajuste do modelo. Para o cálculo foi utilizado o programa Statistica 6.0. O valor de *Lack-Of-Fit* deve ser maior que 0,5 para se afirmar, com 95% de confiança, que não há falta de ajuste no modelo e, portanto o mesmo pode ser utilizado.

Seletividade: a seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas obtidos a partir de amostra branco e com os obtidos a partir de amostra branco fortificada com o fármaco, os metabólitos e o padrão interno, verificando a presença de outros produtos que poderiam estar presentes na matriz e

influenciar na capacidade analítica do método. Segundo o Guia VICH GL49, é aceitável a presença de interferentes na amostra branco nos tempos de retenção dos analitos se a resposta não for maior que 20% da resposta obtida na concentração do respectivo LOQ.

Avaliou-se, também, o efeito matriz como parâmetro de seletividade do método, mesmo que este parâmetro não seja preconizado pelo guia tomado como referência. Os resultados do efeito matriz foram obtidos a partir da comparação dos sinais advindos do processamento do extrato fortificado com os analitos e com os analitos preparado em solvente.

Precisão: a avaliação da precisão foi realizada a partir de repetições do método analítico de forma intradia e interdias. A precisão intradia foi avaliada pela repetição do método em triplicatas ($n=3$) de amostras branco fortificadas em três níveis de concentração do ABZ, ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂ (50, 100 e 150 ng g⁻¹) no mesmo dia. A precisão interdias foi avaliada nos mesmos três níveis de concentração descritos, no entanto, as repetições das análises foram realizadas em três dias diferentes ($n=3$). Todo o procedimento foi realizado pelo mesmo analista, mesmo equipamento, e expresso como coeficiente de variação (CV, %).

Como critérios de aprovação quanto a precisão, segundo o guia VICH GL49 (VICH GL49, 2015), tem-se a tabela 6.

Exatidão: a exatidão (ou veracidade) foi avaliada mediante testes de recuperação. Para tanto, a exatidão foi obtida a partir dos mesmos experimentos realizados para a avaliação da precisão (intra e interdias), porém, com os resultados expressos em porcentagem do valor esperado.

Tomou-se como referências os critérios de aceitação para cada parâmetro avaliado, os preconizados pelo guia de validação VICH GL49 (2015). Veja tabela 6.

Tabela 6. Critérios para aprovação dos parâmetros de precisão e exatidão conforme o guia VICH G49 (2015).

Concentração	Precisão intradia (CV, %)	Precisão Interdias (CV, %)	Faixa de Aceitação para Exatidão (Rec, %)
$\geq 10 \text{ ng g}^{-1} < 100 \text{ ng g}^{-1}$	15	23	70 a 110
$\geq 100 \text{ ng g}^{-1}$	10	16	80 a 110

Efeito residual (*carry over*): além dos parâmetros definidos pelo guia VICH GL49 (2015), avaliamos o efeito residual ou *carry over* das amostras. Para isso, foram injetadas no sistema uma amostra branco fortificada com os analitos na concentração do limite superior de quantificação (LSQ), nesse caso o último nível da curva analítica (200 ng g^{-1}), e posteriormente, duas injeções da amostra branco.

De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2012), para os critérios de aceitação, as respostas obtidas no branco devem ser inferiores a 20% das respostas dos mesmos na concentração do Limite Inferior de Quantificação (LIQ). Para o padrão interno, a resposta do branco deve ser inferior a 5% da resposta obtida na concentração de 100 ng g^{-1} do padrão interno (FNC).

Para avaliar a estabilidade dos analitos e a adequação do sistema analítico durante as injeções foram injetadas soluções padrão controle, solução com todos os analitos na concentração de 100 ng mL^{-1} , após sequência de injeções.

Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

Os LOD para cada analito foram estimados através de análises de 10 amostras de matriz branco do filé, e calculado como descrito na equação abaixo:

$$LOD = 3 \times \left(\frac{S_{branco}}{a} \right)$$

Onde, “Sbranco” representa o desvio-padrão da resposta das dez replicatas e “a” representa os coeficientes angulares das respectivas curvas analíticas obtidas para cada analito na matriz branco fortificada.

O LOQ do procedimento analítico foi definido como o nível de concentração mais baixo da curva analítica no qual foi demonstrado que os critérios de veracidade e precisão foram atendidos (MAPA, 2011).

3.2.5 Ensaio de depleção residual do albendazol e seus metabólitos e estimativa do período de carência

Inicialmente, o ensaio de depleção residual seria realizado em tilápia e tambaqui. Porém, o tambaqui é um peixe pouco resistente às condições climáticas da região sudeste (região onde o experimento foi realizado) e difícil de ser encontrado para comercialização pelos produtores locais. Devido a este motivo, o substituímos pela patinga (híbrido obtido pelo cruzamento da fêmea da espécie pacu, *Piaractus mesopotamicus*, com o macho da pirapitinga, *P. brachypomus*). A patinga é um peixe resistente e, como o tambaqui, possui alta porcentagem de lipídeos na sua composição corpórea.

O estudo de depleção residual teve como objetivo avaliar o perfil de eliminação do ABZ e seus metabólitos, em filé de tilápia e patinga (músculo e pele em proporção natural) após administração oral da matéria-prima do antiparasitário, via ração, e estimar, após a análise estatística, o período de carência a ser recomendado para cada espécie.

Para o estudo de depleção residual do ABZ e seus metabólitos nos filés 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. Essa dose é a recomendada na literatura (Shaikh, 2003).

Os animais foram alocados em caixas de 500 L, a água foi aerada e renovada constantemente. Parâmetros de qualidade da água (temperatura, pH e nível de oxigênio) foram monitorados para mantê-los dentro de níveis aceitáveis (figuras 2 e 3). 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 dez peixes. Os períodos avaliados foram de 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a medicação. Os animais do grupo controle da patinga (n=10) e tilápia (n=10) receberam ração livre de ABZ e foram os primeiros a serem abatidos.

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 à tarde.

Os animais foram eutanasiados por prolongamento do plano anestésico, através de imersão em solução de benzocaína (figura 4), como recomendado pelo Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais (CFMV, 2012). Após o abate, os peixes foram pesados individualmente (figura 5), as escamas foram retiradas e, então, foi realizada a coleta dos filés (músculo e pele). Na sequência, os filés foram embalados, identificados e armazenados em freezer (- 20 °C) até as análises.

O estudo experimental foi realizado no Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (CAUNESP), localizado em Jaboticabal, SP. O desenvolvimento deste estudo foi aprovado e realizado em acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP (Anexo I) (Protocolo nº 19.013/16).

Figura 2 e 3. Caixas de fibra com capacidade para 500 L de água contendo renovação de água e oxigenação complementar utilizadas nos experimentos.

Figura 4. Peixes eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico. Balde com solução de benzocaína e peixes da espécie patinga imersos.

Figura 5. Tilápia sendo pesada em balança analítica após eutanásia.

A partir da análise dos resultados obtidos das amostras, a curva de depleção residual foi construída e o período de carência mínimo para cada espécie foi estimado, para as condições de cultivo empregadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do albendazol em filé de peixe

4.1.1 Configuração do sistema LC-MS/MS

A Fenacetina foi escolhida como padrão interno, devido a alguns fatores: é uma substância estável, não reage com nenhum componente da amostra, elui próximo aos outros analitos e não é utilizada na medicina no Brasil. As condições de eluição da fase móvel para a separação cromatográfica foram definidas conforme a tabela 7.

Tabela 7. Gradiente utilizado no método cromatográfico para a determinação dos analitos para as duas espécies de peixes (Busatto et al, 2017).

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
17,0	90	10

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

Um cromatograma característico de monitoramento do ABZ, ABZSO, ABZSO₂, ABZ-2-NH₂SO₂ em amostra branco de filé de tilápia (músculo e pele) fortificado é apresentado na figura 6.

54

Figura 6. Exemplo de Cromatograma na amostra branco de filé (músculo e pele) fortificada na concentração de 100 ng g^{-1} com os analitos (ABZ, ABZSO, ABZSO₂, ABZ-2-NH₂SO₂) e o PI (FNC). Separação realizada por gradiente de fase móvel (Acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico e Água acidificada com 0,1% de ácido fórmico).

As propriedades físico-químicas (Tabela 8) de cada substância foram importantes para a interpretação e definição do método cromatográfico.

Tabela 8. Propriedades físico-químicas do (A) ABZ, (B) ABZSO, (C) ABZSO₂, (D) ABZ-2-NH₂-SO₂, (E) FNC (PubChem).

	ABZ	ABZSO	ABZSO ₂	ABZ-2-NH ₂ -SO ₂	FNC
Massa molecular (g mol⁻¹)	265,33	281,33	297,33	239,29	179,21
pK_a	7,80	7,07	6,88	6,80	14,98
Coefficiente de partição octanol- água (K_{ow})	2,20-2,92	0,82-0,94	0,90-1,01	0,69-0,75	1,58

O valor de pK_a em particular fornece informações importantes em relação as propriedades de solubilidade e troca iônica dos resíduos. É sabido que os benzimidazóis possuem um anel imidazólico contendo tanto átomos de nitrogênio

ácido quando de nitrogênio básico. Sob condições adequadas a molécula pode estar protonada ($pK_a \sim 5-6$) ou desprotonada ($pK_a \sim 12$).

O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) é também uma importante propriedade. Ele indica a solubilidade desses resíduos em diferentes solventes e as condições necessárias para a cromatografia líquida.

4.1.2 Procedimento de preparo de amostra e extração

O método de extração foi baseado no desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (Busatto et al., 2016), o qual o empregou em estudo semelhante ao presente, porém, envolvendo a espécie pacu. Este método empregou a técnica QuEChERS – rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro –, procedimento proposto em 2003 por *Anastassiades* para análise multirresíduos de praguicidas em alimentos (Anastassiades et al. 2003). Essa técnica de preparo de amostras é composta por três etapas: extração com solvente, seguida de partição promovida pela adição de sais (“*salting out*”), e uma etapa de limpeza do extrato.

O QuEChERS original utiliza ACN como solvente extrator, o qual possibilita a extração de uma menor quantidade de interferentes lipofílicos da matriz e proporciona a extração de substâncias com uma ampla faixa de polaridades. Para a etapa de partição, faz-se uso de NaCl e $MgSO_4$, que promoverá o efeito “*salting out*”, etapa importante para a remoção da água presente no extrato e para o favorecimento da transferência dos analitos para a fase orgânica, ademais, a hidratação do $MgSO_4$ é uma reação exotérmica, resultando no aquecimento da amostra durante a etapa de partição, o que também favorece a extração de compostos apolares. Na etapa de limpeza do extrato, emprega-se o sorvente PSA (do inglês, Primary Secondary Amine), permutador iônico fraco que interage fortemente com os compostos ácidos extraídos previamente (por exemplo, açúcares, ácidos graxos e ácidos orgânicos), que visa complexar os interferentes da matriz que ainda estiverem presentes no extrato e, após agitação e centrifugação, promove a obtenção de um extrato limpo, compatível para injeção no sistema LC-MS/MS (Zanella et al, 2015).

Algumas adaptações ao método de Busatto et al (2016) foram realizadas visando a simplificação do método. No referido trabalho, a etapa final envolvia a evaporação de 2 mL do sobrenadante após a etapa de limpeza e centrifugação, e posterior dissolução do resíduo em 1 mL de ACN:solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (1:1).

Testamos o método com e sem a etapa de secagem, em que se observou que sem a etapa de secagem a recuperação e detectabilidade do método para todos os analitos foram melhores. Além disso, a eliminação da etapa de secagem simplificou o método e diminuiu significativamente o tempo total da etapa de extração. Dessa forma, foi decidido não utilizar a secagem no processo de extração.

4.1.3 Avaliação do método de extração

4.1.3.1 Eficiência de extração

Para a avaliação da eficiência de extração foi calculada a relação em porcentagem (%) entre a área do pico obtida na matriz branco fortificada nas concentrações 10, 50, 100, 150 e 200 ng g⁻¹ e a área do pico obtida no extrato fortificado para os mesmos níveis de concentração para cada analito e para o PI. Os resultados obtidos para a tilápia e o tambaqui são mostrados na tabela 9.

Tabela 9. Eficiência de Extração para as espécies de tilápia e patinga, em porcentagem (%), para ABZ, ABZSO, ABZSO₂, ABZ-2-NH₂SO₂ e FNC.

TILÁPIA					
conc. (ng g⁻¹)	Eficiência de Extração (%)				
	ABZ	ABZSO	ABZSO₂	ABZ-2-NH₂SO₂	FNC
10	65	65	72	53	62
50	75	68	78	56	80
100	72	66	76	55	80
150	76	69	78	57	81
200	75	66	74	53	82
PATINGA					
10	60	68	77	60	65
50	67	65	79	62	65
100	75	69	73	58	71
150	77	62	70	59	73
200	83	64	69	52	74

Os resultados de eficiência de extração foram muito parecidos para as duas espécies de peixes e apresentaram-se adequados ao que se propõe o método. Deve-se reiterar que esse parâmetro não é considerado na validação, mas sim para o desenvolvimento do método, no sentido de se constituir num parâmetro que possa nos balizar visando a otimização do mesmo.

4.1.4 Avaliação da confiabilidade do método analítico

4.1.4.1 Seletividade

A seletividade em métodos cromatográficos é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito seja proveniente exclusivamente do mesmo e não

de outros compostos presentes na amostra (Paschoal, Rath, Airoidi, & Reyes, 2008). Para a avaliação desse parâmetro, comparou-se os cromatogramas obtidos a partir das amostras branco de filé de tilápia e patinça (músculo e pele em proporções naturais) e de amostras branco fortificadas com os analitos (ABZ, ABZSO, ABZSO₂, ABZ-2-NH₂SO₄ e FNC) na concentração de 10 ng g⁻¹.

O método mostrou-se seletivo para todos os analitos nas amostras das duas espécies de peixes, sendo que não se identificou a presença de outros componentes na matriz, que pudessem influenciar nos resultados, cujo sinal cromatográfico fosse maior do que 20% da resposta obtida nos LOQ (10 ng g⁻¹) de cada analito e do PI. Ver Figuras 7 e 8.

Figura 7. Cromatogramas encontrados para cada analito em uma amostra fortificada a 10 ng g^{-1} em filé de peixe (músculo e pele).

Figura 8. Cromatogramas encontrados para cada analito em amostra branco de filé.

Também foi considerado o efeito matriz na avaliação da seletividade do método, importante para averiguar se há possíveis interferentes causados pelas substâncias que compõe a matriz amostral, gerando diminuição ou ampliação do sinal instrumental, especialmente importante quando se emprega a técnica de espectrometria de massas. Os resultados do efeito matriz foram obtidos a partir da comparação dos sinais advindos do processamento do extrato fortificado e do analito puro em solvente (MAPA, 2011).

Para a amostra de tilápia, observou-se para todos os analitos na maioria das concentrações um incremento do sinal analítico. Já nas amostras de patinga, observou-se supressão do sinal analítico para todos os analitos. A diferença dos resultados encontrados para o efeito matriz nas duas espécies pode ser atribuída a diferente composição corpórea que as duas espécies apresentam. Os resultados obtidos do efeito matriz para a tilápia e a patinga são mostrados na tabela 10 e 11, respectivamente.

Tabela 10. Efeito matriz, em porcentagem (%), encontrado para os filés de tilápia.

Analito	Efeito matriz (%) ± SD
ABZ	36,2 (±9,0)
ABZSO	1,8 (±7,0)
ABZSO₂	9,8 (±7,0)
ABZ-2-NH₂SO₂	3,0 (±9,0)

Tabela 11. Efeito matriz, em porcentagem (%), encontrado para os filés de patinga.

Analito	Efeito matriz (%) ± SD
ABZ	-23,2 (±11,0)
ABZSO	-45,2 (±8,0)
ABZSO₂	-21,6 (±7,0)
ABZ-2-NH₂SO₂	-20,6 (±7,0)

Para conter o efeito matriz, as curvas analíticas utilizadas foram as curvas em matriz fortificada (MAPA, 2011), empregando-se amostras branco das diferentes espécies de peixe.

4.1.4.2 Curva analítica e linearidade

As curvas analíticas utilizadas para a quantificação do ABZ e seus metabólitos no filé foram elaboradas fortificando-se 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 homogeneizado (músculo e pele), que recebeu a adição apropriada das soluções estoques de modo a se obter as concentrações apontadas acima. As linearidades foram expressas pelos respectivos coeficientes de regressão linear (*r*) das curvas analíticas de cada analito. Segundo o guia VICH GL49 (2015), a curva analítica deve contemplar ao menos cinco níveis de concentrações e a aceitabilidade de fatores de ponderação na regressão deve ser avaliada pela distribuição dos erros residuais de cada nível de concentração das curvas analíticas preparadas em triplicata.

Após plotar o gráfico com as concentrações (eixo “*x*”) e a razão do sinal do analito e do sinal do padrão interno (eixo “*y*”), observou-se que o método foi linear para todos os analitos nas duas espécies utilizadas, sendo que todos apresentaram um “*r*” superior a 0,99 (Figuras 9 e 10) e o gráfico de resíduos não demonstrou perfil de tendência, comprovando a adequação do método para a faixa de trabalho estabelecida e sem a necessidade de ponderação. Podemos verificar os gráficos de distribuição residuais da tilápia e da patinga nas figuras 11 e 12, respectivamente.

A falta de ajuste (“*Lack-of-Fit*”) foi determinada para avaliar se existiria algum valor anormal nos resíduos e verificar o ajuste do modelo, a partir do teste de Cochran. Todos os valores foram maiores que 0,05 para as duas espécies, como mostrado na tabela 12.

Figura 9. Curvas analíticas para todos os analitos em filé de tilápia. Eixo “x” = Concentração (ng g^{-1}) e eixo “y” = razão do sinal do analito e do sinal do padrão interno concentrações (eixo “x”) e a razão do sinal do analito e do sinal do padrão interno (eixo “y”).

Figura 10. Curvas analíticas para todos os analitos em filé de patinga. Eixo “x” = Concentração (ng g⁻¹) e eixo “y” = razão do sinal do analito e do sinal do padrão interno concentrações (eixo “x”) e a razão do sinal do analito e do sinal do padrão interno (eixo “y”).

Tabela 12. Valores obtidos para o teste de falta de ajuste (lack-of-fit).

	ABZ	ABZSO	ABZSO2	ABZ-2-NH2SO2	Critério de aprovação
Valor-p (<i>Lack-of-fit</i>)	0,20-0,58	0,95	0,09-0,84	0,16-0,70	$\geq 0,05$

Figura 11. Gráficos da distribuição de erros residuais na espécie de Tilápia. Eixo “x” = resíduos e Eixo “y” = Concentração (ng g^{-1}).

Figura 12. Gráficos da distribuição de erros residuais na espécie de patinga. Eixo “x” = resíduos e Eixo “y” = Concentração (ng g^{-1}).

4.1.4.3 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão intradia foram avaliadas através de amostras branco fortificadas com três níveis de concentração: 50, 100 e 150 ng g^{-1} . O procedimento foi realizado em triplicata ($n=3$) para cada nível no mesmo dia. A precisão e exatidão interdias foram avaliadas para os mesmos três níveis de concentração descritos acima, com repetição em três dias diferentes.

De acordo com o recomendado no guia VICH GL49 (2015), os resultados de intervalo aceitável para exatidão e precisão nas faixas de concentração utilizadas são mostrados na tabela 13.

Tabela 13. Intervalo aceitável para precisão e exatidão, segundo o guia VICH GL49.

Concentração do analito (ng g^{-1})	Intervalo aceitável		
	Exatidão	Precisão	
		Intradia	Interdia
$\geq 10 < 100$	70%-110%	15%	23%
≥ 100	80%-110%	10%	16%

Os resultados de precisão e exatidão intra e interdias para o ABZ e seus metabólitos para as duas espécies de peixes são apresentados na Tabela 14 e todos se encontram de acordo com os valores preconizados pelo guia.

Tabela 14. Resultados obtidos Precisão e Exatidão para todos os analitos.

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)	3-7	2	2	2
100 (ng g ⁻¹ , n=3)	1-4	2-6	4-5	2-7
150 (ng g ⁻¹ , n=3)	1	1-2	1-2	1-3
Precisão interdias (CV, %)				
50 (ng g ⁻¹ , n=3)	1 - 7	1-3	1-2	2-3
100 (ng g ⁻¹ , n=3)	0,5-1	1-2	1	2
150 (ng g ⁻¹ , n=3)	2 -2,5	1-2	2	2-3
Exatidão (Recuperação, %) intradia				
50 (ng g ⁻¹ , n=3)	103-105	101-102	101-102	98-100
100 (ng g ⁻¹ , n=3)	96-99	97-99	98	97-104
150 (ng g ⁻¹ , n=3)	95-101	98-102	100-101	95-100
Exatidão (recuperação, %) interdias				
50 (ng g ⁻¹ , n=3)	100-106	99-102	99-101	99-101
100 (ng g ⁻¹ , n=3)	97	97-98	98-100	100
150 (ng g ⁻¹ , n=3)	99	100-101	100	100-104

4.1.4.4 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

Os valores de LOD para as duas espécies de peixe foram calculados a partir da equação demonstrada no item 3.2.4.3 e os resultados podem ser encontrados na tabela 15. De acordo com a ANVISA e FDA, o LOQ deve corresponder ao primeiro nível de concentração da curva analítica, ou seja, definimos o LOQ como 10 ng g⁻¹

para as duas espécies (tilápia e patinga). Para que este valor seja aceito, a resposta para o analito deve ser de pelo menos cinco vezes a resposta obtida para a amostra branco, sendo que a resposta deve possuir uma precisão intradia de 20% e exatidão de 80 a 120%. Os valores de LOQ para os analitos são mostrados na tabela 10.

Tabela 15. Resultados de LOD e LOQ para o ABZ e seus metabólitos.

	ABZ	ABZSO	ABZSO ₂	ABZ-2-NH ₂ SO ₂
LOD (ng g⁻¹)	0,6	0,8	1,8	2,0
LOQ (ng g⁻¹)	10,0	10,0	10,0	10,0
Precisão	12,9	0,8	1,8	7,3
Exatidão (CV, %)	95,0	103,2	105,0	103,6

Para o LOQ definido, todos os critérios de foram aceitos.

4.1.4.5 Efeito residual (*carry over*)

Os resultados do efeito residual encontrado para o ABZ e seus metabólitos obtidos para cada analito encontram-se na tabela 16.

Tabela 16. Efeito residual (%) encontrado para o ABZ e seus metabólitos e para o padrão interno.

	ABZ	ABZSO	ABZSO ₂	ABZ-2-NH ₂ SO ₂	Aceitação FNC	Aceitação
Efeito residual (%)	10,69	2,98	2,91	1,06	≤ 20	1,31 ≤ 5

Podemos observar que para todos os analitos o efeito residual não foi significativo.

4.2 Determinação do albendazol na ração

4.2.1 Método analítico empregando LC-MS/MS

As condições de monitoramento dos analitos no sistema LC-MS/MS tomou como referência o método desenvolvido por Busatto et al. (2017) para albendazol em ração em nosso laboratório de pesquisa, o qual apresentou bons resultados para o que foi proposto. Portanto, 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. Um cromatograma característico de monitoramento do ABZ e da FNC em amostra branco de ração fortificada com os analitos é apresentado na figura 13.

Figura 13. Cromatograma característico de monitoramento do ABZ e do padrão interno em amostra branco de ração fortificada na concentração de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.2 Extração do albendazol na ração

O procedimento de extração foi baseado no trabalho de Busatto et al (2017) para a quantificação do albendazol na ração. No caso do estudo mencionado, o antiparasitário foi incorporado a ração através de revestimento com o polímero etilcelulose e apresentou ótimos resultados de eficiência de extração, precisão e exatidão.

Para avaliar o método de extração escolhido para a ração incorporada com albandazol através da solução de gelatina a 5% (m/m), a eficiência de extração foi avaliada. Assim, calculou-se a relação em porcentagem (%) entre a área do pico obtida na ração branco fortificada nas concentrações 400, 600, 800, 1000 e 1200 ng g⁻¹ e a área do pico obtida no extrato fortificado para os mesmos níveis de concentração para o ABZ e a FNC. A faixa de eficiência de extração encontrada foi 80 a 92 %, demonstrando que o método de extração é eficiente.

As amostras de ração analisadas foram escolhidas aleatoriamente, tentando coletar amostras de toda a extensão do béquer.

4.2.3 Avaliação analítica do método para a ração

4.2.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi estabelecida pela comparação dos cromatogramas entre a amostra branco fortificada com o ABZ e a FNC (PI) e a amostra branco de ração após o procedimento de extração. Conforme mostrado nas figuras 14 e 15, podemos observar que não há componentes na ração que possam afetar a detectabilidade do analito no espectrômetro de massas.

Figura 14. Cromatogramas obtidos da amostra branco de ração para FNC e ABZ.

Figura 15. Cromatogramas obtidos da amostra branco de ração fortificada com ABZ e PI ($800 \mu\text{g g}^{-1}$).

Para avaliar a seletividade do método, também foi realizado a estimativa do efeito matriz, visando averiguar se houve diminuição ou ampliação da resposta instrumental. Não observamos efeito matriz significativo.

4.2.3.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela construção da curva analítica média (realizada em triplicata) das amostras branco de ração fortificadas em cinco níveis de concentração ($400, 600, 800, 1000$ e $1200 \mu\text{g g}^{-1}$) usando a FNC ($800 \mu\text{g g}^{-1}$) como PI. A curva analítica média, a equação linear e o gráfico de resíduos obtidos para o ABZ são apresentados na figura 16 e 17, respectivamente.

Figura 16. Curva analítica média obtida para o ABZ na ração.

Figura 17. Gráfico de distribuição de resíduos do ABZ na ração.

A curva analítica apresentou coeficiente de regressão linear (r) superior a 0,99 e o gráfico de distribuição de resíduos não demonstrou perfil de tendência, comprovando a adequação do método para a faixa de trabalho estabelecida.

4.2.3.3 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram obtidas a partir de ensaios intradia e interdias (n=3). Portanto, foram analisadas três amostras branco de filé fortificados antes do procedimento de extração nas concentrações 400, 800 e 1200 $\mu\text{g g}^{-1}$. Os resultados de precisão foram avaliados a partir do coeficiente de variação (CV, %) e a exatidão foi avaliada por teste de recuperação (%), ou seja, os resultados obtidos foram transformados em porcentagem da quantidade conhecida do analito após desenvolvimento do procedimento de extração

Como observado na tabela 17, os resultados de precisão e exatidão intra e interdias estão de acordo com o guia do MAPA (2011).

Tabela 17. Resultados de precisão e exatidão para o ABZ na ração.

Parâmetros	ABZ	Referência
Linearidade (r)	> 0,99	>0,99
Precisão intradia (CV, %)		
400 ($\mu\text{g g}^{-1}$, n=3)	3,7	≤ 15
800 ($\mu\text{g g}^{-1}$, n=3)	4,8	≤ 15
1200 ($\mu\text{g g}^{-1}$, n=3)	5,7	≤ 10
Precisão interdias (CV, %)		
400 ($\mu\text{g g}^{-1}$, n=3)	4,0	≤ 15
800 ($\mu\text{g g}^{-1}$, n=3)	7,4	≤ 15
1200 ($\mu\text{g g}^{-1}$, n=3)	3,4	≤ 15
Exatidão Intradia (Teste de recuperação, %)		
400 ($\mu\text{g g}^{-1}$, n=3)	101,1	80 - 110
800 ($\mu\text{g g}^{-1}$, n=3)	99,9	80 - 110
1200 ($\mu\text{g g}^{-1}$, n=3)	101,6	80 - 110
Exatidão Intradia (Teste de recuperação, %)		
400 ($\mu\text{g g}^{-1}$, n=3)	104,5	80 - 110
800 ($\mu\text{g g}^{-1}$, n=3)	103,8	80 - 110
1200 ($\mu\text{g g}^{-1}$, n=3)	101,6	80 - 110

4.2.4 Avaliação do processo de incorporação do albendazol na ração

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 foram alimentados duas vezes ao dia (de manhã e à tarde), que o peso médio de cada peixe utilizado neste estudo seria de 500 g e que o ABZ será administrado em dose única, a ração deve conter 1,0 g ABZ por Kg de ração.

Após avaliar o método para a determinação de ABZ na ração, empregando LC-MS/MS, procedeu-se a análise em replicatas (n=5) da ração preparada com ABZ, observamos que houve perda de aproximadamente 33% de ABZ durante processo de incorporação na ração, esta perda foi corrigida para a produção da ração medicada utilizada no estudo com os animais. Contudo, os resultados para as replicatas indicaram boa uniformidade de incorporação do fármaco na ração, com CV de 4,1%. Veja a tabela 18.

Tabela 18. Análise da ração preparada com o ABZ.

Replicatas	Concentração de ABZ (g kg ⁻¹)	Média	CV (%)
1	0,69	0,67	4,1
2	0,62		
3	0,66		
4	0,69		
5	0,67		

4.2.5 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.

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

Tabela 19. Porcentagem de perda de ABZ em função do tempo.

Tempo de coleta (min.)	Porcentagem média de fármaco liberada
5	0,02
15	0,13
30	0,60
60	2,68

O ensaio de lixiviação demonstrou que a incorporação do albendazol na ração com a solução de gelatina a 5% é uma estratégia promissora.

Considerando que a ração permaneça em contato com a água durante 60 minutos, a perda de medicamento não será superior a 3% (Tabela 19). Esses dados demonstram que o processo 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.

Ademais, a ração manteve sua fluviabilidade na água mesmo após transcorridos os 60 minutos. E ao ser administrada aos peixes, ela foi rapidamente consumida, portanto a palatibilidade provavelmente não foi alterada.

4.3. Resultado ensaio de depleção residual do albendazol

A tilápia, como já exposto, é a principal espécie criada na aquicultura brasileira, sendo de grande importância econômica e comercial. A patinga (*Piaractus brachypomus*) é um híbrido do cruzamento do pacu e da pirapitinga. Essa espécie possui composição de teor de lipídeos muito parecida com o tambaqui (típica da região norte do Brasil) e é de fácil criação e comercialização na região sudeste (SP), devido a sua resistência e adaptabilidade a diferentes temperaturas. Devido à falta de informações sobre o metabolismo do ABZ em espécies nativas, a patinga foi escolhida como modelo desse experimento. E para, ao final das análises estatísticas e estimativa do período de carência, comparar as diferenças na depleção dessas duas espécies, já que possuem diferentes quantidades de gordura corporal.

No presente estudo, para avaliar a depleção do antiparasitário ABZ e seus metabólitos e estimar o período de carência, cada espécie foi alocada em caixas de 500 L. Após a administração da ração contendo o fármaco, foram selecionados

aleatoriamente dez animais para cada período de abate (8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas).

As análises das amostras advindas do estudo foram realizadas conforme descrito no item 3.2.3.

A temperatura ($30,3 \pm 0,2$ °C), o pH ($6,8 \pm 0,1$) e o nível de oxigênio ($6,95 \pm 0, \text{mg L}^{-1}$) das caixas de água onde os peixes estavam alocados foram monitorados durante todo o período do estudo. Os filés (músculo e pele) foram retirados dos dois lados de cada animal.

4.3.1 Avaliação dos resultados de depleção do albendazol e seus metabólitos em filés de patinga

A eliminação do fármaco em tecidos biológicos segue o modelo de eliminação cinética de um compartimento, sendo descrita por termo exponencial.

Dessa forma, os dados do estudo de depleção do ABZ e seus metabólitos foram analisados a partir desse modelo. Para tal, utilizamos o programa GraphPadPrism® (versão 5.0). As curvas de depleção conforme os marcadores monitorados são apresentadas na figura 16.

As concentrações médias do ABZ, ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂ encontradas após as análises nos filés de patinga estão apresentadas na tabela 20.

Tabela 20. Resultado das concentrações dos resíduos marcadores encontradas no filé (músculo e pele) de patinga.

Peixe	Peso (g)	Abate	Concentração do Resíduo Marcador (ng g ⁻¹)				
			ABZ	ABZSO	ABZSO ₂	ABZ-2-NH ₂ SO ₂	SOMA
1	76	8 horas após o tratamento	23	204	11	<LOQ*	243
2	101		16	77	<LOQ*	<LOQ*	103
3	57		50	609	31	<LOQ*	695
4	82		175	989	41	<LOQ*	1210
5	95		52	579	27	<LOQ*	663
6	91		68	338	<LOQ*	<LOQ*	417
7	96		170	512	13	<LOQ*	700
8	62		16	40	<LOQ*	<LOQ*	66
9	79		103	516	17	<LOQ*	641
10	-		102	463	14	<LOQ*	584
Média	82						
Desvio	15						
11	57	12 horas após o tratamento	78	985	45	<LOQ*	1112
12	79		281	588	32	<LOQ*	905
13	68		190	717	27	<LOQ*	938
14	87		139	593	24	<LOQ*	761
15	85		79	248	11	<LOQ*	343
16	79		67	131	<LOQ*	<LOQ*	208
17	95		92	562	32	<LOQ*	691
18	94		53	683	34	<LOQ*	776
19	65		95	655	19	<LOQ*	773
20	66		30	59	<LOQ*	<LOQ*	99
Média	77						
Desvio	13						
21	87	24 horas após o tratamento	<LOQ*	56	13	<LOQ*	78
22	68		<LOQ*	138	32	<LOQ*	180
23	100		<LOQ*	42	14	<LOQ*	66
24	74		<LOQ*	187	52	<LOQ*	249
25	84		<LOQ*	220	41	<LOQ*	271
26	66		<LOQ*	129	35	<LOQ*	174
27	86		<LOQ*	47	26	<LOQ*	83
28	68		<LOQ*	580	57	<LOQ*	647
29	79		<LOQ*	49	22	<LOQ*	81
30	103		<LOQ*	48	22	<LOQ*	80
Média	81						
Desvio	14						

31	87	48 horas após o tratamento	51	18	<LOQ*	<LOQ*	79
32	83		28	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*	43
33	88		25	<LOQ*	13	<LOQ*	48
34	125		16	<LOQ*	30	<LOQ*	56
35	92		<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*	20
36	53		<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*	20
37	64		15	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*	29
38	71		<LOQ*	21	24	<LOQ*	55
39	60		<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*	20
40	49		<LOQ*	<LOQ*	33	<LOQ*	48
Média	65						
Desvio	15						
41	73	72 horas após o tratamento	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOQ
42	55		<LOD**	<LOQ*	<LOQ*	<LOD**	<LOQ
43	107		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOQ
44	62		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOQ
45	62		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOQ
46	67		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOQ
47	59		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOQ
48	59		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOQ
49	51		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOQ
50	53		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOQ
Média	58						
Desvio	6						
51	59	96 horas após o tratamento	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
52	62		<LOD**	<LOQ*	<LOQ*	<LOD**	<LOD**
53	68		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
54	69		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
55	51		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
56	55		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
57	76		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
58	86		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
59	94		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
60	88		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
Média	73						
Desvio	15						
61	57	120 horas após o tratamento	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
62	65		<LOD**	<LOQ*	<LOQ*	<LOD**	<LOD**
63	76		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
64	87		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
65	90		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
66	75		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
67	69		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
68	70		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
69	-		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
70	-		<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**	<LOD**
Média	76						
Desvio	9						

* Abaixo do Limite de Quantificação (considerou-se 5 ng g^{-1} , ou seja, $\frac{1}{2}$ do LOQ para o cálculo da soma)

** Abaixo do Limite de Detecção (considerou-se $\frac{1}{2}$ do LOD para o cálculo da soma)

Para que os dados de um estudo de depleção residual possam ser empregados numa análise estatística que vise estimar um período de carência, é necessário que se disponha de pelo menos três períodos de abate em que as concentrações residuais indiquem um perfil terminal de eliminação, ou seja, que as concentrações dos resíduos marcadores estejam diminuindo conforme aumenta o tempo entre o início do tratamento com a medicação e o abate.

Os resultados da Tabela 20 revelam que as concentrações dos resíduos marcadores ABZ, ABZSO e ABZSO₂ aumentaram do primeiro abate (8 h) para o segundo (12 h), o que era esperado devido a rápida biotransformação do ABZ em seus metabólitos. No entanto, as concentrações se mostram decrescentes a partir do período de 12 horas, sendo que apenas para a soma das concentrações dos resíduos marcadores foi possível obter níveis de concentração quantificáveis até as amostras do período de 48 horas, de forma a se obter o mínimo de três pontos amostrais (12, 24 e 48 horas após o tratamento) representando a fase terminal da depleção residual (concentração decrescente). Considerando que as amostras coletadas correspondentes aos demais períodos de abate apresentaram concentrações abaixo do LOQ ou LOD, estas não podem ser incluídas nas análises de estimativa de período de carência.

Dessa forma, tomando os resultados obtidos para a soma das concentrações dos resíduos marcadores do ABZ, obtivemos a curva de depleção residual (modelo quadrático) apresentada na Figura 18.

Figura 18. Curva de depleção residual considerando a soma dos resíduos marcadores do ABZ. LMR: Limite Máximo de Resíduo (100 ng g^{-1}).

Na Figura 18, nota-se que as amostras dos peixes abatidos no período de 48 horas após o tratamento com o ABZ apresentam concentrações para a soma dos resíduos marcadores inferiores aos LMR. No entanto, para estimar o período de carência mínimo, o guia VICH GL57 recomenda modelar a curva de depleção no sentido de gerar uma reta a partir da transformação dos dados de concentração em função logarítmica. Assim sendo, procedeu-se a regressão linear da fase terminal de depleção dos resíduos marcadores monitorados do ABZ a partir das concentrações obtidas transformadas pela função logarítmica neperiana (Ln), sendo o gráfico resultante apresentado na Figura 19.

Figura 19. Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual considerando a soma dos resíduos marcadores do ABZ. LMR: Limite Máximo de Resíduo ($\text{Ln}_{\text{LMR}} = 4,6$); (a): reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%.

As análises da regressão linear dos dados cinéticos descrevem a depleção terminal de um resíduo marcador adequado, permitindo estimar o período de carência, tomando-se como referência o LMR estabelecido para o marcador (100 ng g^{-1}) e o tecido alvo em questão. O período de carência é estimado quando o limite de tolerância da concentração residual se encontra abaixo do valor de LMR. O limite de tolerância fornece um intervalo no qual se localiza um percentil da população com um nível de confiança. A FDA recomenda empregar 99% de percentil e 95% de confiança para essa avaliação (reta c da Figura 19). Conforme mostra a Figura 19, ambas as retas relacionadas aos limites de tolerância (retas b e c) não cruzam a linha do eixo y do gráfico correspondente ao LMR, de modo que se faz necessária uma extrapolação dos resultados para que se possa estimar um período de carência mínimo a ser recomendado a partir dos estudos realizados, o que infere alguns erros estatísticos inerentes à extrapolação. Porém, se assumíssemos esse risco (Figura 20), o período de carência mínimo seria o de 64 horas, o que corresponderia a 2,7 dias, para o que se recomenda o arredondamento para cima. Portanto, o período de

carência mínimo para o uso de ABZ via oral, na dose única de 10 mg/kg/PV em patinga, nas condições de temperatura média de 30 °C é de 3 dias.

Figura 20. Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual considerando a soma dos resíduos marcadores do ABZ. LMR: Limite Máximo de Resíduo ($\text{Ln}_{\text{LMR}} = 4,6$); (a): reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%.

Para avaliar a adequação do modelo de cinética de eliminação de um compartimento para dados registrados do estudo com patinga, foram feitas as seguintes hipóteses de regressão (EMA, 2018):

a. Homogeneidade de variâncias: a homogeneidade foi confirmada pelo teste de Cochran ($P < 0,05$);

b. Ln-linearidade: a falta de ajuste do modelo de regressão linear foi avaliada pelo teste ANOVA, não resultando em desvio significativo da linearidade ($P < 0,05$);

c. Normalidade dos erros: a normalidade foi avaliada pelo teste de plotagem dos resíduos ordenados versus sua distribuição de frequência acumulada em uma escala de probabilidade normal; além disso, o teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para validar os resultados obtidos a partir do gráfico residual e a normalidade dos erros foi confirmada ($\alpha = 0,05$).

4.3.2 Avaliação dos resultados de depleção do albendazol e seus metabólitos em filés de tilápia

Os resultados analíticos obtidos das amostras de filés de tilápia quanto às concentrações de ABZ e seus metabólitos são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Resultados analíticos das amostras de filé (músculo + pele) de tilápia.

Peixe	Peso (g)	Abate	Concentração do Resíduo Marcador (ng g ⁻¹)				
			ABZ	ABZSO	ABZSO ₂	ABZ-2-NH ₂ SO ₂	SOMA
1	124	8 horas após o tratamento	24	115	19	<LOQ	163
2	130		96	168	26	<LOQ	295
3	120		15	266	43	<LOQ	329
4	106		18	68	12	<LOQ	103
5	135		38	294	33	<LOQ	370
6	102		27	63	12	<LOQ	107
7	96		32	368	38	<LOQ	444
8	116		15	511	69	<LOQ	601
9	117		13	47	10	<LOQ	75
10	113		14	122	20	<LOQ	160
Média	116						
Desvio	12						
11	106	12 horas após o tratamento	38	463	49	<LOQ	555
12	127		18	23	<LOQ	<LOQ	51
13	113		13	49	<LOQ	<LOQ	73
14	114		14	182	38	<LOQ	239
15	122		12	183	26	<LOQ	226
16	202		15	134	20	<LOQ	174
17	203		<LOQ	60	12	<LOQ	82
18	203		<LOQ	12	<LOQ	<LOQ	27
19	188		<LOQ	85	13	<LOQ	108
20	194		40	482	111	<LOQ	637
Média	157						
Desvio	44						
21	168	24 horas após o tratamento	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
22	186		<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ
23	176		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
24	153		<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ
25	165		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
26	138		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
27	148		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
28	104		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
29	122		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
30	153		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
Média	138						
Desvio	22						

31	218	48 horas após o tratamento	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
32	187		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
33	232		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
34	145		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
35	226		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
36	144		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
37	92		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
38	174		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
39	114		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
40	161		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
Média	152						
Desvio	47						
<hr/>							
41	127	72 horas após o tratamento	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
42	117		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
43	115		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
44	100		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
45	125		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
46	149		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
47	153		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
48	109		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
49	154		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
50	266		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
Média	160						
Desvio	55						
<hr/>							
51	206	96 horas após o tratamento	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
52	165		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
53	133		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
54	133		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
55	158		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
56	170		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
57	171		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
58	182		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
59	199		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
60	158		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
Média	163						
Desvio	23						
<hr/>							
61	171	120 horas após o tratamento	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
62	157		<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
63	160		<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
64	150		<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
65	208		<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
66	211		<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
67	226		<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
68	185		<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
69	196		<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Média	186						
Desvio	28						

Na Tabela 21, pode-se verificar que a partir do período de abate correspondente a 24 horas após o término do tratamento com a ração medicada

com ABZ, as concentrações dos resíduos marcadores estiveram abaixo do LOQ do método analítico empregado. Dessa forma, apenas os períodos de 8 e 12 horas após o tratamento com ABZ resultaram em amostras com concentrações quantificáveis dos resíduos marcadores ABZ, ABZSO e ABZSO₂. Ainda, pode-se verificar que as concentrações dos marcadores nas amostras aumentaram com o tempo, considerando os períodos amostrados. Dessa forma, não foi possível monitorar o decaimento das concentrações dos marcadores nos tempos de abate realizados, o que não nos permitiu obter o mínimo de três pontos da fase de depleção residual para que pudéssemos estimar um período de carência mínimo nas condições de medicação empregadas neste estudo.

A rápida metabolização da tilápia pode estar relacionada com o baixo teor de gordura corporal que é atribuída a essa espécie de peixe, além da alta temperatura da água que foi conduzido o experimento (30 °C), que pode ter contribuído para o aumento da cinética metabólica do peixe.

4.3.3. Estudos de depleção residual do ABZ em peixes reportados na literatura.

Shaikh et al. (2003) avaliaram o perfil de depleção residual do ABZ e seus principais metabólitos (ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂) em músculo e pele das espécies: truta-arco-íris, tilápia e salmão. O antiparasitário foi administrado em dose única de 10 mg (Kg de peso vivo)⁻¹, por via oral. O ABZ foi eliminado após 24 h na truta e na tilápia e em 48 h no salmão. O ABZSO foi eliminado após 48 h na tilápia, 72 h na truta e 96h no salmão. O ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂ foram detectados em baixas concentrações até 96 h para as três espécies.

Em 2006, o grupo de Shaikh et al. avaliaram a depleção de ABZ e seus metabólitos no tecido muscular de bagre-americano. O ABZ foi administrado por gavagem oral em dose única de 10 mg (Kg de peso vivo)⁻¹. Os pesquisadores reportaram que o ABZ e o ABZSO estavam presentes em baixas concentrações até 8h após o tratamento, sendo portanto, rapidamente metabolizados. 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, o grupo de Shaikh et al. estudou o perfil de depleção residual do ABZ e seus metabólitos no tecido muscular do robalo listrado híbrido e do achigã. Os peixes receberam uma dose oral de albendazol a 10 mg kg⁻¹ por gavagem. Os períodos analisados foram 8, 16, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Observou-se que o ABZ e o ABZSO ficaram mais tempo presentes no tecido no achigã do que no robalo riscado híbrido. O ABZ foi detectado até 8 h no robalo riscado híbrido e até 48 h no achigã. 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. O experimento foi realizado em faixa de temperatura de 18 a 22 °C para as duas espécies.

YU et al. (2011) conduziram estudos de depleção residual do ABZ e seus metabólitos em tecido muscular da perca amarela. Como os demais estudos, o fármaco foi administrado uma única vez por gavagem oral na concentração de 10 mg (Kg de peso vivo)⁻¹. O ABZ, foi rapidamente metabolizado e detectado apenas até 24 horas após a administração. O 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). Os autores sugerem que o ABZSO₂ pode servir como um marcador potencial para identificar o uso do ABZ nessas espécies de peixe.

Em 2016, nosso grupo de pesquisa avaliou o perfil de depleção residual do ABZ e seus principais metabólitos na espécie de pacu (*Piaractus mosepotamicus*) (Busatto et al. 2017). O fármaco foi administrado via ração em dose

única de 10 mg ABZ kg⁻¹ de peso vivo. Os resultados demonstraram que o pacu metabolizou o ABZ em ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂. O fármaco original, o ABZ, foi rapidamente metabolizado e o metabólito ABZSO₂ foi o mais persistente no tecido. Os pesquisadores consideraram como marcador a soma das concentrações de cada metabólito e do fármaco original, seguindo como recomendado pela EMA. O grupo obteve um período de carência de 7 dias para o ABZ nos filés de pacu.

Tabela 22. Trabalhos na literatura de estudos de depleção residual do ABZ e seus metabólitos.

Auto- res	Espécie	Peso (g)	Parâmetros físico- químicos da água		Tecido	Dose (mg kg peso vivo ⁻¹)	Via de Administração	Período de permanência dos resíduos nos tecidos	Resíduo marcador
			Temperatura (°C)	Ph					
1*	Truta-arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	285 ± 50	12		Músculo e pele	10	Via oral, gavagem	ABZ – 24h ABZSO – 72h	na
	Tilápia híbrida (<i>Oreochromis niloticus</i> x <i>O. mosambicus</i>)	254 ± 54	25	7,5	Músculo e pele		Via oral, gavagem	ABZ – 24h ABZSO – 48h	na
	Salmão do atlântico (<i>Salmo salar</i>)	896 ± 114	15		Músculo e pele		Via oral, gavagem	ABZ – 48h ABZSO – 96h	na
2**	Bagre-americano (<i>Ictalurus punctatus</i>)	896 ± 114	25	7,5	Músculo		Via oral, gavagem	ABZ e ABZSO – 8h ABZSO2 – 48 a 72h	ABZSO ₂
3***	Achigã (<i>Micropterus salmoides</i>)	548	20	7,5	Músculo e pele	10	Via oral, gavagem	ABZ – 8h ABZSO – 96h	ABZSO ₂
	Robalo listrado híbrido	1195						ABZ – 48h ABZSO – 48h	ABZSO ₂
4****	Perca amarela (<i>Perca flavescens</i>)	278 ± 40	22	7,5	Músculo e pele	10	Via oral, gavagem	ABZ – 24h ABZSO – 48h a 72h ABZSO2 – 48h ABZ-2- NH2SO2 – 72h a 96h	ABZSO ₂
5*****	Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	500 ± 59	24.4 ± 0.5	8.3 ± 0. 1	Músculo	10	Via ração	2 a 7 dias	Soma ABZ e metabólitos

*Shaikh et al. 2003

** Shaikh et al. 2006

*** Shaikh et al. 2009

**** YU et al. 2011

***** Busatto et al. 2017

Nos resultados de Busatto et al. (2017) para a espécie de Pacu, estimou-se um período de carência de 7 dias para o ABZ. Neste trabalho, o período de carência estimado para a Patinga foi de 3 dias. Os dois trabalhos consideraram como resíduo marcador a soma do fármaco original com seus principais metabólitos, como

recomendado pela EMA. Estas duas espécies de peixe são nativas do Brasil e do grupo de peixes redondos, sendo a patinga o cruzamento do pacu com a pirapitinga. A diferença que obtivemos no período de carência para essas duas espécies, pode ser explicada pelo fato de que no estudo de Busatto et al. (2017) os peixes de pacu estavam bem maiores que a patinga, aproximadamente 500 g e 70 g, respectivamente. Além disso, a temperatura da água durante o experimento foi diferente. No estudo com o pacu a temperatura se encontrava em torno de 25 °C, já no estudo com a patinga a temperatura da água estava em torno de 30 °C.

Conclusões

5. Conclusões

O processo de incorporação do ABZ na ração com a solução de gelatina 5% apresentou diversas vantagens: fácil preparação e baixo custo, procedimento rápido, uniformidade da dose do fármaco, baixa taxa de lixiviação do fármaco para a água, a capacidade de flutuabilidade da água não foi afetada, os peixes comeram facilmente a ração, o que podemos inferir que provavelmente não alterou a palatibilidade da mesma. Por ser um procedimento simples, os próprios produtores poderiam preparar a ração na hora da administração de forma segura, sem ser necessário adquirir uma ração previamente preparada.

O processo de extração dos analitos apresentou resultados satisfatórios e compatíveis para o emprego em LC-MS/MS, fornecendo extratos limpos, boa detectabilidade e seletividade.

Os métodos analíticos desenvolvidos para a determinação da concentração do ABZ na ração desenvolvida e para a determinação do ABZ e seus metabólitos nos filés de peixe (músculo e pele em proporções naturais) 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 tomados como referência neste trabalho.

O ensaio com os peixes da espécie patinga permitiu estabelecer curvas de depleção da soma dos resíduos (ABZ, ABZSO, ABZSO₂ e ABZ-2-NH₂SO₂), as quais se ajustaram a um modelo exponencial de primeira ordem. No caso da espécie de tilápia, não foi possível estabelecer a curva de depleção, já que o albendazol foi rapidamente metabolizado e após 12 h não foi possível detectar resíduo do fármaco original e seus metabólitos. Portanto, observamos que os resíduos permaneceram por mais tempo na espécie de patinga, mesmo a tilápia pesando mais no momento do experimento, aproximadamente 150 g e 70 g, respectivamente. As duas espécies apresentaram a mesma rota metabólica, porém com diferentes taxas de eliminação do fármaco.

Os resultados desse estudo demonstram que a espécie de peixe patinga e tilápia, após administração oral de dose única de 10 mg de ABZ (Kg peso vivo)⁻¹ e em um ambiente a 30 °C, são capazes de metabolizar o ABZ em ABZSO, ABZSO₂, porém para o metabólito ABZ-2-NH₂SO₂, as concentrações estavam abaixo do LOQ

e LOD em todos os períodos amostrados, o que sugere que essas duas espécies apresentam baixas concentrações desse metabólito após tratamento.

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 patinga foi estimado em 3 dias. Se fossemos considerar como marcador apenas o ABZ-2-NH₂SO₂, como estabelecido pelo *Codex* e a *Agência de Saúde do Canadá*, não seria necessário período de carência para o uso do ABZ em tilápia e patinga, pois nenhuma das duas espécies apresentaram concentrações de resíduos em níveis quantificáveis no tecido (<LOQ).

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do MAPA (Brasil) 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 este plano, também não seria necessário período de carência para o uso do antiparasitário, já que este foi rapidamente biotransformado nas duas espécies escolhidas neste estudo. 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.

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, considerando as condições climáticas das diferentes regiões do país.

Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

- Anastassiades, M., S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, and F. J. Schenck. 2003. "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* 86(2):412–31.
- Arbeláez-Rojas, G. A., Fracalossi, D. M., & Fim, J. I.. 2012. Composição Corporal de Tambaqui, *Colossoma macropomum*, e Matrinxã, *Brycon cephalus*, em Sistemas de Cultivo Intensivo, em Igarapé, e Semi-Intensivo, em Viveiros. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol.31 n.3.
- Ashley, P.J., 2007. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104(3–4), pp.199–235.
- Brasil 2014. Ministério da Pesca e Aquicultura. 1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura.
- Busatto,Z., 2016. 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 em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP.
- Busatto, Z., Fernando, A. & Freitas, O. De, 2017. Food Additives & Contaminants : Part A LC-MS / MS methods for albendazole analysis in feed and its metabolite residues in fish fillet and a leaching study in feed after an alternative procedure for drug incorporation. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 0(0), pp.1–11.
- Cantelmo, O. A.; Pezzato, L. E.; Barros, M. M. ; Pezzato, A. C. 2002. Características físicas de dietas para peixes confeccionadas com diferentes aglutinantes. *Acta Scientiarum*, v. 24, n.4, p. 949-955.
- Carlsson G., Patring J., Ulleras E., Oskarsson A. (2011). Developmental toxicity of albendazole and its three main metabolites in zebrafish embryos. *Reproductive Toxicology* 32, p. 129 – 137.

CFMV, 2012. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais – Conceitos e Procedimentos Recomendados. Brasília.

Chagas, E. C., de Araújo, L. D., Martins, M. L., Gomes, L. C., Malta, J. D., Varella, A. B., & Jerônimo, G. T. 2016. Mebendazole dietary supplementation controls Monogenoidea (Platyhelminthes: Dactylogyridae) and does not alter the physiology of the freshwater fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). 185-189.

CODEX ALIMENTARIUS, 1993 – International Food Standards. Veterinary Drug Residues in Food, Albendazole

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

Delatour, P. & Parish, R. 1986 Benzimidazole anthelmintic and related compounds: toxicity and evaluation of residues. In *Drug Residues in Animals*. Ed. Rico, A.G. Academic Press, Orlando, FL. pp. 175–204.

EMA. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. 2008. Disponível em: www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits-Report/2009/11/WC500014151.pdf

Evans, E.R., Hasbrouck, N. & Shaikh, B., 2011. Residue depletion of albendazole and its metabolites in aquacultured yellow perch (*Perca flavescens*). , pp.22–24.

FAO, 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Estado mundial de La pesca y La acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de La FAO. Roma.

FAO, 2012. Food & Agriculture Organisation. The State of World Fisheries and Aquaculture 2012

FAO, 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *The state of world fisheries and aquaculture*

FAO, 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture: Contributing to Food Security and Nutrition for All.

FAO, 2018. Food and Agriculture Organisation. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018.

Feng, J. Bin, Jia, X. P., & Li, L. D. (2008). Tissue distribution and elimination of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. caureus*) after a single oral administration in freshwater and seawater at 28°C. *Aquaculture*, 276(1–4), 29–35

FDA. U.S. Food and Drug Administration 2011. Fish and fishery products hazards and controls guidance. Chapter 11: Aquaculture drugs. 4^a Edition.

FDA, Food and Drug Administration., 2015. Guidance for Industry Studies to Evaluate the Metabolism and Residue Kinetics of Veterinary Drugs in Food-Producing Animals: Validation of Analytical Methods Us ed in Residue Depletion Studies

Ferrer, C., Malato, O., & Agüera, A. 2013. Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in fruit and vegetables: Screening and quantitative studies. *Journal of Chromatography A*, 1287, 24–37.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.065>

Hashimoto, Juliana C. et al. 2012. “A Simple Method for the Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green Residues in Fish by a Modified QuEChERS Extraction and LC/MS/MS.” *Journal of AOAC International* 95(3):913–22.

Hashimoto, J. C., Paschoal, J.A.R., Queiroz, J. F., Reyes, F.G. 2011. “Considerations on the Use of Malachite Green in Aquaculture and Analytical Aspects of Determining the Residues in Fish: A Review.” *Journal of Aquatic Food Product Technology* 20:273–94.

JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committe on Food Additives. 2009. Toxicological Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food.

Jiang, Yan, Ping Xie, and Gaodao Liang. 2009. “Distribution and Depuration of the Potentially Carcinogenic Malachite Green in Tissues of Three Freshwater Farmed Chinese Fi Sh with Different Food Habits.” *Aquaculture* 288:1–6.....

JSA. Federal Joint Subcommittee on Aquaculture. 2007. Guide to drug, vaccine and pesticide use in aquaculture.

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

Kinsella, B., Lehotay, S. J., Mastovska, K., Lightfield, A., Furey, A., & Danaher, M. (2009). New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 637(April 2009), 196–207.

Korolkovas, A; França, F. F. A. C. 2009. Dicionário Terapêutico Guanabara. 16 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Kwon, H., Lehotay, S. J., & Geis-Asteggianti, L. (2012). Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography-mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops. *Journal of Chromatography A*, 1270, 235–245.

Leonhardt, J. H., filho, M. C., Frossard, H., & Moreno, a. M.. 2006 Características morfológicas, rendimento e composição do filé de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, da linhagem tailandesa, local e do cruzamento de ambas. v.1.

Lopes, R. P. et al. 2012. 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.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2011. Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários.

Matabaro, E., Ishimwe, N., Uwimbabazi, E., & Lee, B. H. (2017). Current

Immunoassay Methods for the Rapid Detection of Aflatoxin in Milk and Dairy Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 808–820.

Martins, M. L.. 2004. Cuidados Básicos e Alternativas no Tratamento de Enfermidades de Peixes na Aquicultura Brasileira. Em R.-P. M. T., & R. Lizama, Sanidade de Organismos Aquáticos (pp. 355-368).

McKellar, Q.A. & Scott, E.W. (1990) The benzimidazole anthelmintics agents – a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 13, 223–247.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura, 2014. *1º Anuário brasileiro da pesca e aquicultura*.

Naylor, Rosamond L. et al. 2000. “Effect of Aquaculture on World Fish Supplies.” *Nature* 405:1017–24.

ONAKA, E. M.; MORAES, F. R. de. 2008. Enfermidades parasitárias de peixes.LAPOC- Laboratório de patologia de organismos aquáticos Caunesp.Jaboticabal SP.

Paschoal, J.A.R. et al., 2008. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, 31(5), pp.1190–1198.

Pharmaq 2014. Romet[®] 30 brochure. Disponível em: <https://www.pharmaq.no/sfiles/5/23/5/file/romet_brochure_english_2014.pdf>.

Acesso em: 30 de agosto de 2017.

Prestes, O. D., Adaime, M. B., & Zanella, R. (2011). QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scientia Chromatographica*, 3(1), 51–64.

Quesada S. P., Paschoal, J. A., Reyes F. G. (2013). Considerations on the Aquaculture Development and on the Use of Veterinary Drugs: Special Issue for

Fluoroquinolones – A Review.

Reimschuessel, R., Food, U.S. & Usfda, D.A., 2005. Assessing the human health implications of new veterinary drugs used in fish farming, Woodhead Publishing Limited.

Rigos, G., Alexis, M. N., Andriopoulou, A., & Nengas, I. (2002). Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, at two water temperatures. *Aquaculture*, 210(1–4), 59–67.

Sapkota, A. et al., 2008. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. *Environment International*, 34(8), pp.1215–1226.

Shaikh, B. et al., 2006. Metabolism and depletion of albendazole in the muscle tissue of channel catfish following oral treatment. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29(6), pp.525–530.

Shaikh, B.; Rummel, N.; Gieseke, C.; Serfling, S.; Reimschuessel, R. 2003. Metabolism and residue depletion of albendazole and its metabolites in rainbow trout, tilapia and atlantic salmon after oral administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 26, p. 421-427.

Shaikh, B. et al. 2009. 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.

SINDAN, 2016. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal - Mercado. Disponível em <http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>, acessado em 11/08/2016.

Spinosa, D. S.; Górnica, S. L.; Bernardi, M. M. 2011. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 5º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Silva, G. R. da, Lima, J. A., Souza, L. F. de, Santos, F. A., Lana, M. A. G., Assis, D. C. S. de, & Cançado, S. de V. (2017). Multiresidue method for identification and quantification of avermectins, benzimidazoles and nitroimidazoles residues in bovine

muscle tissue by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) using a QuEChERS approach. *Talanta*, 171(May), 307–320.

Soares Júnior, M. Caliari, M; Chang, Y.K. 2004. Substituição de farelos de soja por soja integral em rações extrusadas para aquicultura. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.34, p. 29-37.

Whelan, M., Kinsella, B., Furey, A., Moloney, M., Cantwell, H., Lehotay, S. J., & Danaher, M. (2010). Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry with rapid polarity switching, 1217, 4612–4622.

World Bank, 2013. Fish to 2030: Prospects for fisheries and aquaculture. *Agriculture and environmental services discussion paper*, 3(83177), p.102.

World Health Organization -WHO 2009. Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. Geneva, p. 42

Zanella, R. et al. 2015 QuEChERS. In: *Preparo de amostras para análises de compostos orgânicos*. p.230-244.

Zhang, X.; Hanxiang, X.; Zhang, H.; Yuanming, G.; Zhiyuan, D.; Chen, X. 2011 Simultaneous determination of albendazole and its metabolites in fish muscle tissue by stable isotope dilution ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, p. 727-734.

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

Anexo

ANEXO I

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Estimativa e avaliação do período de carência do Albendazol e seus metabólitos em peixes**", protocolo nº 19.013/16, sob a responsabilidade do Prof.^a Dr.^a Fabiana Pilarski, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho 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 FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 14 de dezembro de 2016.

Vigência do Projeto	07/01/2017 a 31/07/2018
Espécie / Linhagem	<i>Oreochromis niloticus</i> (Tilápia do Nilo) e <i>Colossoma macropomum</i> (Tambaqui)
Nº de animais	200
Peso / Idade	500g
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Piscicultura

Jaboticabal, 14 de dezembro de 2016.

Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA