UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de método analítico para determinação de fármacos veterinários por eletroforese capilar em ração para peixes

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado (a): Luciana Pereira Lourenço

Orientador (a): Cristiane Masetto de Gaitani

Coorientador: Jonas Augusto Rizzato Paschoal

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 12/06/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2017

RESUMO

LOURENÇO, L.P. **Desenvolvimento de método analítico para determinação de fármacos veterinários por eletroforese capilar em ração para peixes.** 71f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A piscicultura vem se destacando no âmbito nacional, uma vez que o Brasil apresenta uma significativa disponibilidade de recursos hídricos e condições geográficas e climáticas favoráveis, que permitem a criação de espécies exóticas e nativas. Devido ao intuito comercial e financeiro, os produtores utilizam o sistema de produção em cativeiro, que constitui em um ambiente favorável à disseminação de doenças, devido à maior densidade populacional dos animais, com o agravante de que o ambiente aquático propicia a proliferação de doenças infecciosas. Desta forma, o uso de medicamentos veterinários constitui-se num recurso importante para amenizar e/ou solucionar este problema, com destaque ao emprego de antimicrobianos da classe das quinolonas e sulfonamidas, por exemplo. A principal via de administração desses medicamentos é por ingestão oral através da ração. Portanto, a incorporação de fármacos na ração é um aspecto crítico e de grande importância quando se visa a garantia da dose de tratamento dos animais, bem como, os riscos relacionados à contaminação ambiental decorrentes de eventual lixiviação dos fármacos da ração para a água. Frente a isso, métodos analíticos voltados para a quantificação de fármacos na ração são imprescindíveis. Diante da vantagem de se contar com um método analítico versátil, capaz de ser aplicado à determinação simultânea de diferentes fármacos, o emprego da eletroforese capilar constitui numa promissora alternativa. Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método para análise de seis quinolonas (ciprofloxacino, difloxacino, ofloxacino, ácido oxolínico, flumequina e enrofloxacino) e quatro sulfonamidas (sulfametazina, sulfadimetoxina, sulfametoxazol e sulfatiazol) simultaneamente por eletroforese capilar. Para isso, foi utilizado um capilar de sílica fundida, de 50 cm de comprimento efetivo e 75 μm de diâmetro interno e eletrólito de corrida composto por uma solução de borato de sódio na concentração de 40 mmol L^{-1} , 15% de metanol e pH 8,5, corrente de 60 μA , temperatura de 35 $^{\circ}\text{C}$ e detecção em 255 nm. Nessas condições, houve a separação dos dez fármacos em menos de 20 minutos. Os parâmetros de desempenho analítico, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, seletividade e robustez foram avaliados e estão de acordo com os requisitos preconizados pelos guias oficiais. O método foi aplicado para quantificar os fármacos na ração após a incorporação e no estudo de lixiviação dos fármacos. Após 10 minutos de exposição na água, houve uma perda significativa de CIPRO (11%) e MTZ (16%), correspondendo a 1,650 mg g^{-1} /peixe/dia e 2,400 mg g^{-1} /peixe/dia, respectivamente. Assim, a lixiviação mostrou ser um fator que deve ser considerado na terapêutica dos animais na piscicultura, uma vez que pode contribuir para ineficiência do tratamento, resistência bacteriana e prejudicar a qualidade da água.

Palavras-chave: Antimicrobianos; Eletroforese Capilar; Lixiviação; Piscicultura

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é considerada uma atividade multidisciplinar, referente ao criação/produção de organismos aquáticos, incluídos neste contexto, plantas aquáticas, moluscos, crustáceos e peixes, sendo que a intervenção ou manejo do processo de criação é imprescindível para o aumento da produção (OLIVEIRA, 2009). Esta prática é considerada diferente da pesca, que consiste na retirada de organismos aquáticos da natureza de forma extrativa, ou seja, sem cultivo prévio (SEBRAE, 2015).

A aquicultura consiste numa atividade mundialmente importante, constituindo-se numa significativa fonte alimentícia e numa atividade alternativa de renda. Dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* – FAO) mostram que a contribuição da aquicultura, para os estoques de suprimentos mundiais continua crescendo, saltando da significância de 3,9% em 1970 para 32,4% em 2014, representando cerca de um milhão de toneladas e 59,4 milhões de toneladas, respectivamente. Para fins de comparação, o setor vem apresentando taxa de crescimento de 8,8% há várias décadas, 1,2% comparado com a pesca e 2,8% com a criação pecuária (FAO, 2014).

O Brasil apresenta uma significativa disponibilidade de recursos hídricos, aliada a condições geográficas e climáticas favoráveis, que permitem a criação de espécies aquícolas exóticas e nativas, o que reflete um panorama com alto potencial para a exploração econômica da aquicultura (CREPALDI et al., 2006; OLIVEIRA, 2009). Em virtude disso, a produção aquícola nacional tem crescido acima da média mundial desde 1995, apresentando um crescimento médio de 21,1% ao ano, enquanto a evolução mundial ao ano foi de cerca de 9,5%. Progressivamente, o Brasil vem ganhando posições no ranking internacional estabelecido pela FAO, em que 1994, era o 32º em produção aquícola e o 26º em termos de valores, sendo que em 2004 ocupava o 18º lugar no ranking mundial de produção aquícola, com 0,5% da produção mundial, e o 12º em termos de receitas geradas com 1,4% do total (FAO, 2014).

No mundo, a prática que mais se destaca na aquicultura é a piscicultura, uma vez que os peixes representam o principal grupo de espécies aquícolas produzidas, tanto em termos de peso quanto em valor de mercado, correspondendo 53% da produção aquícola (SANTOS, 2009). A oferta da produção de pescados está intimamente ligada à crescente procura por esse tipo de alimento ao longo dos anos, principalmente por ser uma fonte rica em proteínas de baixo custo (ARANA, 2004). De acordo com o

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2010), o Brasil, com seu grande potencial geográfico, segue a tendência de consumo de 12 kg/habitantes/ano.

O Brasil reúne diversas condições que propiciam o desenvolvimento da piscicultura. Dentre elas estão: o clima favorável, o enorme potencial hídrico tanto na água doce, salobra e no mar (cerca de 5,3 milhões de hectares de água em represas, mais a costa e os estuários), a boa disponibilidade de áreas mecanizáveis, a grande oferta de insumos (alevinos e rações comerciais para peixes), a disponibilidade de recurso humano especializado, a criação de linhas de crédito específicas, o incentivo governamental às exportações e uma grande diversidade de peixes nativos com grande potencial zootécnico e de mercado (AYROZA, 2009). A participação relativa na produção brasileira se concentra nas regiões nordeste, sul, centro-oeste, sudeste e norte, respectivamente.

De maneira geral, os sistemas de produção são diferenciados conforme o grau de interferência do criador no ambiente aquícola (densidade de estocagem, práticas de manejo e uso de insumos), das trocas de água na unidade de criação e da produtividade. De forma simples e direta pode-se definir, basicamente, três tipos de sistemas de criação em aquicultura:

- **Extensivo:** é muito utilizado por pequenos produtores em pequenas áreas de espelho d'água, no qual não se utiliza ração comercial e os organismos aquáticos são alimentados, tradicionalmente, com subprodutos agrícolas, obtendo-se baixa produtividade. Tratando-se de piscicultura, deve-se ressaltar que este sistema também é empregado em grandes represas, com o repovoamento feito com alevinos, e do qual o peixe é retirado através da pesca tradicional de pequena escala. Neste caso, a produtividade ainda é pequena e varia com a capacidade de suporte do corpo d'água. Neste sistema o período de criação é mais longo, variando de 12 a 18 meses e são obtidas produtividades entre 150 a 500 kg ha⁻¹, mas com baixo risco e custo de produção.
- **Semi-intensivo:** é o mais utilizado no Brasil e já emprega alguma tecnologia de criação, como: viveiros-berçário, ração comercial e controle (básico) da qualidade da água. Neste sistema, a produtividade pode chegar até a 16 ton ha⁻¹ por ano.
- **Intensivo:** Este sistema utiliza tecnologias mais sofisticadas, gestão da produção e apresenta produtividades maiores que os sistemas anteriores. Esse sistema tem como característica principal a utilização de: i) em terra - pequenos tanques com

alta densidade de estocagem e alta renovação de água; ii) em lagos, açudes e reservatórios de hidrelétricas – tanques-rede e gaiolas. Com o sistema intensivo pode-se obter alta produtividade, algumas vezes acima de 30 ton ha⁻¹ por ano.

Dentre os diferentes modelos de produção de pescado, destacam-se os cultivos em regime intensivo. Esse tipo de produção apresenta como principais vantagens o aproveitamento de ambientes aquáticos já existentes, como mar, rios, grandes reservatórios, açudes, canais de irrigação; além de apresentarem menor variação dos parâmetros físico-químicos da água durante a criação, maior facilidade de retirada dos peixes para venda, menor investimento inicial, facilidade de movimentação e relocação dos peixes, intensificação da produção, facilidade de observação diária dos peixes permitindo a descoberta precoce de doenças (SANDOVAL JR, et al., 2013).

Por outro lado, existem algumas desvantagens neste tipo de produção. Os peixes criados em sistemas de confinamento estão mais vulneráveis a doenças, devido ao estresse proporcionado pela maior densidade populacional dos animais. Esta condição pode promover uma queda na resistência natural dos peixes contra diversos tipos de patógenos, comprometendo o bom desenvolvimento desse sistema de criação, além de causar uma queda no desempenho produtivo e mortalidade dos peixes, diminuindo a produção e a lucratividade (OSTI, 2009). Esse estresse pode ainda ser maior durante atividades de manejo dos tanques-redes, principalmente as atividades executadas de forma incorreta, ou por eventuais condições ambientais desfavoráveis, como por exemplo, a qualidade da água de abastecimento (CYRINO, et al., 2010).

A aquicultura vem evoluindo em termos de inovação tecnológica e se adaptando para atender aos novos requisitos do mercado consumidor. Contudo, diante da evidente necessidade de combater e/ou evitar o surgimento e disseminação de doenças infecciosas que acometem o pescado, os piscicultores demandam por medicamentos veterinários, em especial os antimicrobianos (BORDON, 2014).

1.1 Antimicrobianos de uso animal

Os agentes antimicrobianos podem ser definidos como substâncias que têm a capacidade de matar ou inibir o crescimento de microrganismos. Podem ser produzidos por microrganismos como fungos ou bactérias, ou de forma sintética ou semissintética (GASTALHO, et al., 2014).

Depois de sua descoberta, em 1928, os antimicrobianos tornaram-se medicamentos essenciais para tratamentos terapêuticos em organismos animais no mundo todo. Para serem empregados, os antimicrobianos devem ser comprovadamente seguros (não tóxicos) para o hospedeiro, permitindo a sua utilização como agentes quimioterápicos no tratamento de doenças infecciosas bacterianas (GASTALHO, et al., 2014).

Em complemento à sua utilização na medicina humana, os agentes antimicrobianos são também usados em saúde animal e em animais produtores de alimentos, incluindo a piscicultura, sendo, neste caso, classificados como agentes terapêuticos, profiláticos ou metafiláticos. O uso terapêutico refere-se ao uso de medicamentos para tratar animais doentes, o profilático significa a utilização de agentes antimicrobianos como forma de prevenção ao surgimento e/ou desenvolvimento de doenças infecciosas e os metafiláticos são utilizados durante surtos de doenças, visando tratar o grupo de animais doentes simultaneamente com os outros grupos de animais sadios de forma a evitar que a doença se propague (GUARDABASSI, et al., 2014).

1.1.1 Sulfonamidas

As sulfonamidas (SF) compõem um importante grupo de antimicrobianos sintéticos que têm sido usados efetivamente no combate às infecções bacterianas e também na prática veterinária para promover o crescimento animal (SANTOS, 2009).

As SF são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido *para*-aminobenzoico (PABA) e impedem a sua utilização pelas bactérias na síntese do ácido fólico ou vitamina B9. Mais especificamente, as SF são inibidores competitivos da di-hidropteroato-sintetase, a enzima bacteriana responsável pela incorporação do PABA no ácido di-hidropteroico, precursor imediato do ácido fólico. Os microrganismos sensíveis são aqueles que precisam sintetizar seu próprio ácido fólico (GOODMAN, 1992).

As SF têm sido largamente usadas na aquicultura, principalmente em casos de infecção por *Aeromonas sp*, *Pseudomonas sp* e *Vibrio sp*. Essas bactérias estão geralmente envolvidas em doenças como úlceras e septicemia hemorrágica causando grande mortalidade (SAMANIDOU, 2007). A utilização das SF se deve à sua principal característica: fácil absorção através das brânquias e fácil administração por ração ou imersão (PARK, 2012).

A estrutura principal das SF é composta por um anel benzeno, com um grupo amino e um grupo sulfonamida na posição *para*. As variações são dadas pela

substituição do átomo de hidrogênio do grupo sulfonamida e/ou grupo amino. A Figura 1 mostra a estrutura básica de uma sulfonamida e a Tabela 1 mostra suas derivações, as quais foram moléculas deste estudo.

Figura 1. Estrutura básica das SF

Tabela 1. Diferentes variações de SF utilizadas na piscicultura.

Composto	R	Massa molar (g mol ⁻¹)	pKa
Sulfadimetoxina (DMX)		310,3	2,14 / 6,08
Sulfametazina (MTZ)		278,3	2,37 / 7,49
Sulfametoxazol (MXL)		253,2	1,83 / 7,24
Sulfatiazol (TZL)		255,3	2,01 / 7,24

1.1.2. Quinolonas

As quinolonas (QNs) são agentes antimicrobianos, com espectro de atividade focado contra bactérias gram-negativas, gram-positiva, anaeróbicos e micobactérias. Elas são largamente empregadas no tratamento de diversas infecções na medicina humana e veterinária, incluindo a aquicultura (BOTSOGLOU, FLETOURIS, 2001). São muito utilizadas no tratamento da septicemia generalizada e doenças de pele em peixes, exercendo efeito antibacteriano através da inibição da DNA-girase, que é

responsável pela separação dos dois filamentos de DNA de dupla hélice, essencial para a replicação ou transcrição do DNA bacteriano (BUFFÉ, et al., 2001).

Os ácidos oxolínico e nalidíxico (Tabela 2) são os antimicrobianos mais antigos da classe das QN (primeira geração) e até hoje são utilizados mundialmente na profilaxia de doenças bacterianas na piscicultura. A fim de ampliar o espectro de ação e melhorar as características farmacológicas, algumas modificações em sua estrutura básica foram realizadas, dando origem às novas gerações das QN. A principal diferença entre as QN e fluorquinolonas (FQN) é a presença de um átomo de flúor no C-6 e um grupo piperazinil no C-7 nas FQN. Os grupos coplanares do carbonil (C=O) nas posições três e quatro são os responsáveis pelas atividades antimicrobianas das FQN. O átomo de flúor na posição seis é eficaz contra as bactérias gram-negativas e aumenta o espectro de ação para as bactérias gram-positivas (SAMUELSEN, 2006). As principais QN empregadas no uso veterinário e analisadas no presente estudo estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Estruturas químicas, classificações e informações químicas das QN

Composto	Estrutura química	Massa molar (g mol ⁻¹)	pKa
Ácido Oxolínico (OXO)		261,2	5,58
Ciprofloxacino (CIPRO)		331,3	6,08 / 8,41
Difloxacino (DIFLO)		399,3	5,80 / 8,25
Flumeruina (FLU)		261,2	6,35
Ofloxacino (OFLO)		361,2	5,40 / 6,20
Enrofloxacin (ENRO)		359,3	5,70 / 7,97

1.2 Formas de administração dos antimicrobianos na piscicultura

Diferentemente do tratamento de espécies terrestres, o uso de antimicrobianos na piscicultura apresenta características próprias, desde a via de administração do medicamento até a resposta dos peixes ao tratamento. Sua administração aos peixes pode ser conduzida de seis formas diferentes: oral (associada à ração ou como partículas

bioencapsuladas), banho, imersão, spray, injeção e tópica (Tabela 3). A principal via de administração o antimicrobiano utilizado na prática é a oral, através da incorporação do fármaco à ração (TAVARES et al., 2014).

Tabela 3. Formas de administração de antimicrobianos utilizados na piscicultura (TAVARES et al., 2014).

Vias de Administração	Características
Oral (incorporado à ração)	Necessita de componentes palatáveis; baixo risco de contaminação ambiental devido à pequena quantidade
Partículas bioencapsuladas	Necessita de componentes palatáveis; baixo risco de contaminação ambiental devido à pequena quantidade
Banho	Necessário longo tempo de exposição ao fármaco, que é solúvel ou capaz de dispersar adequadamente; necessário elevadas quantidades de fármaco
Imersão	Curta exposição ao fármaco, que deve ser solúvel ou capaz de dispersar adequadamente; problemas com a aquisição do diluente
Spray	Medicamento espalhado sobre o peixe a partir de contenção e curta exposição ao ar. Deve ser solúvel ou capaz de dispersar adequadamente. Pode causar poluição ambiental
Injeção	Realizado somente em peixes de alto valor comercial; geralmente requer anestesia; é laborioso; insignificante o risco de poluição ambiental
Tópico	Realizado apenas para tratamento de úlceras em peixes ornamentais.

Reconhecidamente, a forma mais viável de administração de medicamentos na piscicultura é a via oral, através da ração. Para tanto, existem diferentes formas físicas de ração a serem consideradas para a decisão da melhor opção para adição do(s) fármaco(s):

- i) *Ração farelada*: os ingredientes da ração são apenas moídos e misturados, recebendo a adição do(s) fármaco(s) de interesse(s). Sua utilização não é recomendada, uma vez que as perdas de nutrientes e do(s) fármaco(s) adicionados são muito grandes, causando não só problemas aos peixes, como a poluição da água dos tanques;
- ii) *Ração peletizada*: as partículas menores dos ingredientes são aglomeradas através da combinação de umidade, calor e pressão, dando origem aos péletes. A adição do fármaco ocorre antes do processo de peletização. A estabilidade dos péletes na superfície da água é comprometida, pois ela imerge rapidamente na água;
- iii) *Ração extrusada*: consiste num processo de cozimento em alta temperatura, com pressão e umidade controladas. Esse processo provoca a gelatinização do amido e o pélete sai do extrusor parcialmente expandido, permitindo que a ração fique na superfície da água (boiando), o que facilita a observação do consumo pelos peixes. O fármaco é adicionado antes do processo de extrusão da ração, de modo que a sua estabilidade deve ser considerada antes aos fatores físicos de temperatura e pressão envolvidos no processo de obtenção da ração.
- iv) *Ração aspergida*: consiste no processo de adição do fármaco à ração por aspersão, que consiste na mistura do(s) fármaco(s) em óleo (ou outro material de revestimento), para posterior pulverização dos péletes extrusados de ração. A mistura do fármaco com o óleo mineral visa dificultar a rápida solubilidade do fármaco na água. Atualmente, esta tem sido a forma de adição do fármaco à ração mais empregada na piscicultura (RIBEIRO et al., 2012).

1.3 Administração de fármacos via oral na piscicultura

Em se tratando do fornecimento de fármacos aos peixes via ração, existe um risco que deve ser considerado visando o uso correto da medicação que consiste no processo conhecido como lixiviação. A lixiviação consiste, basicamente, na eluição do fármaco da ração para o ambiente aquático, o que pode comprometer a eficiência da medicação pretendida e gerar riscos para saúde humana e para o ambiente.

A perda do fármaco para o ambiente tem como consequência a perda na eficiência terapêutica, uma vez que a dose do fármaco na ração ingerida pelo peixe não será a mesma inicialmente. Sendo assim, o uso de rações não balanceadas diminui a disponibilidade dos fármacos aos peixes (REZENDE, 2012).

Além disso, o uso excessivo desses fármacos pode induzir o aparecimento de linhagem de bactérias resistentes, ou seja, algumas bactérias conseguem se adaptar ao meio e sobreviver mesmo na presença de antimicrobianos. Desta forma, as bactérias mais resistentes ou mutantes são selecionadas e rapidamente se multiplicam (cerca de 20-30 min uma população de bactéria se multiplica), transmitindo a resistência ao restante da população microbiana. O amplo uso desses fármacos na criação de peixes foi associado com o desenvolvimento de resistência em *Aeromonas hydrophila* e *A. salmonicida* – causadoras de gastroenterites nos peixes; *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri* – causadores de infecções entéricas, meningites e abscessos hepáticos nos peixes; *Vibrio anguillarum* e *V. salmonicida* – causadoras de Vibroses em peixes; *Pasteurella piscicida* e *Yersinia rucke* – causadoras de infecções em peixes (ORLANDO, 2013).

A escolha da forma de incorporação do fármaco à ração a ser empregada como medicação oral aos peixes deve considerar as boas práticas veterinárias de uso dessas substâncias, as quais consistem em, dentre outros fatores, garantir a dose e o período de tratamento a serem empregados. Esses fatores são fundamentais para confirmar que o período de carência recomendado seja realmente eficiente para atestar que os resíduos dos medicamentos veterinários empregados em animais de produção não estejam presentes nos produtos alimentícios em concentrações acima daquelas consideradas toxicologicamente seguras (LMR). Sendo assim, é fundamental a disponibilidade de métodos analíticos confiáveis que permitam assegurar a concentração do fármaco presente na ração, bem como, avaliar possível lixiviação do fármaco incorporado na ração para a água, visando garantir a eficiência farmacológica do princípio ativo envolvido nos peixes e amenizar eventuais riscos de contaminação ambiental. Diante da variedade de fármacos com potencial de emprego na aquicultura, faz-se vantajoso o

emprego de técnicas analíticas de separação que permitam o estabelecimento de métodos analíticos capazes de identificar diferentes fármacos que possam estar presentes na ração, contribuindo para uma maior versatilidade analítica.

1.4 Legislação vigente sobre o uso de antimicrobianos na piscicultura

Alguns países, com o intuito de controlar a qualidade do uso de medicamentos veterinários, elaboraram cartilhas indicando quais antimicrobianos são permitidos para o uso na piscicultura. Nos Estados Unidos, há apenas três antimicrobianos considerados legais para uso na aquicultura, os quais são aprovados pela FDA; são eles: oxitetraciclina, sulfamerazina e a combinação entre sulfadimetoxina e ormetropim (BENBROOK, 2002). No Reino Unido, os antimicrobianos autorizados são: oxitetraciclina, florfenicol, amoxicilina e trimetropim/sulfadiazina (BURRIDGE, et al., 2010). No Canadá estão registrados para o tratamento do pescado a oxitetraciclina, trimetropim/sulfadiazina, sulfadimetoxina/ormetropim e florfenicol (BURRIDGE, et al., 2010). Já no Brasil, apenas dois antimicrobianos estão aprovados para uso na aquicultura: florfenicol e oxitetraciclina.

No Brasil, há dois programas que monitoram a presença de resíduos de medicamentos nos produtos de origem animal. São eles o Programa Nacional de Controle de Análise de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal) e o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet). No caso do monitoramento em pescado, são listados alguns antimicrobianos que passam pelo monitoramento de controle pelo PNCRC, conforme Quadro 7 do Anexo I da Instrução Normativa DAS nº 11, de 07 de maio de 2014: nitrofurazona, furazolidona, furaltadona, nitrofurantoina, cloranfenicol, tianfenicol, florfenicol, sulfametazina, sulfatiazol, sulfadimetoxina, oxitetraciclina, clortetraciclina, tetraciclina, enrofloxacina, ciprofloxacina, sarafloxacina, difloxacina, ácido nalidíxico, ácido oxolínico e flumequina.

1.5 Métodos analíticos para determinação de antimicrobianos em ração utilizados na piscicultura

A dosagem dos fármacos incorporados na ração é de extrema importância para que se possa ter maior segurança sobre a dose de administração dos mesmos aos animais, considerando as boas práticas de uso de medicamentos veterinários. Dessa forma, faz-se essencial que métodos analíticos sensíveis e seletivos estejam disponíveis

para a quantificação dos fármacos de interesse à piscicultura em ração. Para tanto, é importante o desenvolvimento de métodos analíticos com sensibilidade e seletividade adequadas para quantificar eventuais substâncias nesse tipo de matriz.

Para esse tipo de análise, consta na literatura, o emprego de diferentes técnicas analíticas, bem como de diferentes detectores. No início dos anos 1970 a cromatografia em camada delgada foi amplamente utilizada na análise qualitativa de fármacos veterinários, como tireostáticos e sulfonamidas em amostras de origem animal (PRESTES, 2013). Porém, outras técnicas de separação têm sido usadas para a análise de fármacos veterinários, tais como, cromatografia gasosa (GC); cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), mais comumente utilizada devido à reconhecida capacidade de atingir alta seletividade, simplicidade de execução e possibilidade de atingir baixos limites de detecção (LD); e, mais recentemente, a eletroforese capilar (CE). Essas técnicas podem ser utilizadas em associação a diferentes tipos de detectores, como os de ultra-violeta (UV), fluorescência e espectrometria de massas (MS).

A CE é uma das técnicas analíticas mais recentes e vem ganhando espaço na quantificação de fármacos em diferentes áreas (química, bioquímica, ciência forense, laboratórios clínicos, indústrias farmacêuticas etc.) devido às suas diversas vantagens, entre elas o baixo consumo de reagentes e solventes, o que diminui seu custo e colabora com meio ambiente, além de alcançar altos níveis de eficiência, permitindo a separação de compostos com características químicas semelhantes, sendo, portanto, promissora no desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação simultânea de fármacos de diferentes classes terapêuticas (SPUDEIT, et al., 2012).

Quantificar fármacos em qualquer tipo de amostra, geralmente requer métodos seletivos de análise. Há métodos oficiais disponíveis para determinadas substâncias e matrizes que devem ser seguidos. Quando não existem, faz-se necessário o desenvolvimento de novos métodos ou adaptação daqueles já reportados na literatura científica. O desenvolvimento desses métodos tem como base fundamental a confiabilidade nos resultados e para garantir tal resultado, o método utilizado precisa gerar informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ou seja, fornecer evidências objetivas de que os requisitos para uma aplicação ou usos específicos pretendidos serão atendidos (ANVISA, 2012).

Uma revisão na literatura permite encontrar diversos trabalhos que determinam diferentes classes de antimicrobianos de uso animal em matriz biológica de peixes, principalmente na carne, pois há uma reconhecida preocupação em monitorar a presença

de resíduos dessas substâncias nos alimentos. Porém, menor atenção vem sendo dispensada a métodos analíticos voltados à determinação de fármacos veterinários em ração. Conforme discutido anteriormente, há grande interesse em conhecer o perfil de lixiviação dos fármacos na ração, pois isso pode acarretar problemas ambientais, de saúde pública e na terapêutica medicamentosa dos peixes.

Neste sentido, a Tabela 4 apresenta alguns trabalhos descritos na literatura, que reportam métodos analíticos voltados à quantificação dos principais antimicrobianos de uso na piscicultura na ração, utilizando como principal técnica analítica a cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 4. Trabalhos descritos na literatura para quantificar os principais antimicrobianos veterinário em ração para peixes

Fármaco	Técnica Analítica	Referência
Sarafloxacino	HPLC-UV	Bauer, J.F. et al, 1990
Oxitetraciclina	HPLC-UV	Rogstad, A.; Weng B., 1993
Ácido Oxolínico		
Flumequina		
Sulfadiazine	HPLC-UV	Hormazaval, V., et al, 1993
Trimetoprim		
Ácido Oxolínico	HPLC-UV	Touraki, M.et al, 2001
Flumequina		
Enrofloxacino	LC-MS/MS	Danyi, S. et al., 2011
Ciprofloxacino		
Enrofloxacino	HPLC-DAD	Sun, H., et al., 2011
Ciprofloxacino		
Enrofloxacina	HPLC-DAD	Rezende, R.A.E, 2012
Enrofloxacina	HPLC-FLD	Teles, J.A., et al., 2016
Sulfadimethoxine	LC-MS/MS	Fais, A, et. al, 2017
Ormetoprim		

A tabela anterior demonstra a prioridade em utilizar HPLC para quantificar os principais antimicrobianos de uso na piscicultura. No entanto, uma maior diversidade de métodos analíticos, empregando técnicas alternativas e/ou complementares, como por exemplo, a CE, é importante sob o ponto de vista de avanços analíticos na busca de métodos alternativos, rápidos, simples, envolvendo o emprego de ferramentas de custo mais acessível como forma de se obter um menor custo por análise. Devido as suas diversas vantagens, como alta resolução e alta eficiência de separação a técnica de CE oferece condições potenciais para o desenvolvimento de um método analítico de separação para a determinação de várias substâncias concomitantemente, como é o caso das diferentes classes de antimicrobianos que podem ser utilizadas na piscicultura.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho descreveu o desenvolvimento e validação de um método para quantificação de seis fármacos da classe das quinolonas e quatro fármacos da classe das sulfonamidas, por CE associada ao detector de arranjo de diodo, em ração utilizada rotineiramente no cultivo de peixes.

A técnica analítica baseada em CE mostrou-se uma potente ferramenta para a separação de diferentes fármacos simultaneamente, com tempo de análise menor que 20 minutos. Com isso, esse método se torna inovador e de baixo custo, pois pode quantificar 10 fármacos amplamente usados na piscicultura em apenas um método de análise.

Além disso, foi possível conhecer o perfil de lixiviação de cinco fármacos das classes de antimicrobianos quinolonas e sulfonamidas. O estudo mostrou uma predisposição de fármacos mais polares (CIPRO e MTZ) em lixiviar para o meio aquático. Após o período de 10 minutos, que é o tempo médio que a ração permanece na água, houve uma perda de 1,650 mg g⁻¹/peixe/dia para CIPRO e 2,400 mg g⁻¹/peixe/dia para MTZ. Assim, a lixiviação torna-se um fator preocupante na prática de cultivo de peixes, uma vez que a qualidade das rações medicadas fica prejudicada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, S, et al. Methionine Requirement of Juvenile Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*, **Journal of the world aquaculture society**, v. 31, 618 – 626, 2000.

ALMEIDA, A.M., CASTEL-BRANCO, M.M., FALCÃO, A.C.). Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography**, 774, 215–222.

ALTRIA, K.D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation and Applications**. Totowa, New Jersey, USA: Himana Press Inc., 1996. 349.

ALTRIA, K.D. **Buffer preparation – Hints, Tips and Common erros**. LCGC Europe, v. 20, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RE nº 899**, 29 de maio de 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC n. 27, de maio de 2012. **Guia de validação de métodos bioanalíticos**, 2012.

ARANA, L.V. Princípios químicos de qualidade de água em aquicultura. Florianópolis: UFSC, 2004. 231p.

AYROZA, L.M.S. Criação de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, na usina hidrelétrica de Chavantes, Rio Paranapanema, SP/PR. **Tese** (Doutorado Aquicultura). Centro de Aquicultura da UNESP, Campus Jaboticabal. Jaboticabal, 2009.

BENBROOK, C.M. The northwest science and environmental policy center sandpoint. **Antibiotic drug use in U.S. aquaculture**, Idaho, 2002. Disponível em: www.iatp.org/library/antibiotics.

BONATO, P. S.; JABOR, V. P. A.; GAITANI, C. M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 28, 683-91, 2005.

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

BOTSOGLOU, N.A.; FLETOURIS, D.J. **Drug Residues in Foods**, Pharmacology, Food Safety, and Analysis. Marcel Dekker, New York. 2001.

BUFFÉ, et al. Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos na otimização de terapias antimicrobianas. **Caderno de Farmácia**. v. 17, 97-109, 2001.

BURRIDGE, L. et al. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**. v. 306, 7-23, 2010.

BRITO, N. M. et al., Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 129-146, 2003.

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

CARRACHI, S. P et al. Evaluation of experimental infection with *Aeromonas hydrophila* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **International Journal of Fisheries and Aquaculture**. v. 5, 81-84, 2010.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**. v. 32, 1021-1030, 2009.

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

CYRINO, J.E.P, et al. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 68-87, 2010.

DIONISIO, A.,G.,C, et al. Novas tendências em prepare de amostras para cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**. v. 2, 19-29, 2010.

DUBREIL, E. et. al. Validation approach for a fast and simple targeted screening method for 75 antibiotics in meat and aquaculture products using LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 34, 453 – 468, 2017.

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

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

GASTALHO, S.; da SILVA, G.J; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquicultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, vol. 3, 29-45, 2014.

GIEND, C.S.V. Theoretical considerations in performance of various modes of CE. **Capillary electrophoresis methods for pharmaceuticals analysis**. London, In: Academic Press, v. 9, Cap. 6, 123-143, 2008.

GOODMAN, A., RALL, T. W., NIES, A. S., TAYLOR, P., **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 8th edition, McGraw-Hill, New York, 1992.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Princípios da utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. 1.ed, Artmed, Porto Alegre, cap. 1, 17-30, 2008.

GUIDE, L. R., et. al, A simple, fast and sensitive screening LC-ESI-MS/MS method for antibiotics in fish. **Talanta**, 163, 85–93, 2017.

HONORATO, C. A. Growth and survival of *Piaractus mesopotamicus* larvae fed of micro diets. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 23, 71-75, 2016.

JARDIM, I.C.S.F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, 13-25, 2010.

JIMIDAR, M. I. Theoretical considerations in performance of various modes of CE. **Capillary electrophoresis methods for pharmaceuticals analysis**. London, In: Academic Press, v. 9, Cap. 2, p. 9-42, 2008.

KUBITZA, F. **Qualidade da água: no cultivo de peixes e camarões**. 1.ed. Jundiaí, p. 229, 2003.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S. **Capillary Electrophoresis: Principle and Practice**. 1^a ed. Berlin: Springer Laboratory, 1993.

LANDERS, J.P. Introduction to capillary electrophoresis. In: J. P LANDERS (Ed.) **Capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques**, 2007.

LOPEZ-ALVARADO, J. Effect of coating and encapsulation of crystalline amino acids on leaching in larval feeds. **Aquaculture**. v. 122, 335-346, 1994.

MACEDO, A. N. Desenvolvimento de métodos analíticos visando atender aos princípios da química verde na análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino. **Dissertação** (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica). Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, 2012.

MENDONÇA, C.R.B. Desenvolvimento de metodologias para análise direta de óleos vegetais empregando microemulsões de água em óleo e meio não aquoso. **Tese** (Doutorado em Química). Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

MENOTA, S. et al. Bioavailability of coated amoxicillin in pigs feed experiences. **Larger Animal Review**. v. 18, 253-258, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Guia para validação e métodos analíticos e controle de qualidade interna das análises de monitoramento do plano nacional de resíduos e contaminantes – PNCRC/Animal**, Brasília, 2010.

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

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

OLIVEIRA, R.C. O panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, vol.2, 73-89, 2009.

ORLANDO, 2013). ORLANDO, E.D. Resíduos de antibióticos tetraciclínicos em músculo de peixe: comparação de diversos métodos de extração e avaliação por HPLC. **Dissertação** (Mestrado em Química Analítica). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

OSTI, J.A.S. Caracterização da qualidade da água e avaliação do manejo e suas implicações sobre o cultivo de tilápias (*Oreochromis niloticus*). **Dissertação** (Mestrado em Aquicultura e Pesca). **Instituto de Pesca**, São Paulo, 2009.

PARK, et al. Use of antimicrobial agents in aquaculture. **Scientific and Technical Review**, v. 31, p. 189-197, 2012.

PASCHOAL, J. A., RATH, S. Validação de métodos cromatográficos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**. v. 31, 1190-1198, 2008.

PASCHOAL, J. A. et al. Depletion study and estimation of the withdrawal period for oxytetracycline in talapia cultures in Brazil. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 35, 90-96, 2012.

PRESTES, O.D., et al. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 5, 697-710, 2013.

REZENDE, R.A.E. Enrofloxacin na piscicultura: estudo da incorporação do fármaco na ração visando a redução da taxa de lixiviação na água. **Dissertação** (Mestrado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

RIBANI, Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, 771-780, 2004.

RIBEIRO, P.A.P, et al. Manejo alimentar de peixes. **Manejo Nutricional e Alimentar de Peixes de Água Doce**, 2012.

RIGOS G. et al, Myxosporean infections in greek mariculture. **Aquaculture International**, v. 7, 361-364, 1999).

RIZZI, A. Fundamental aspects of chiral separation by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**. v. 22, 3079-3106, 2001.

ROGASTAD, A., WENG, B. Extraction and analysis by high-performance liquid chromatography of antibiotics in a drug delivery system for farmed fish. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, 518-520, 1993.

ROSET, E. et al. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 55, 848-858, 2010.

SAMANIDOU, V. F.; EVAGGELOPOULOU, E. N. Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish. **Journal of Separation Science**, v. 30, 2549-2569, 2007.

SAMUELSEN, O.B. Pharmacokinetics of quinolones in fish: A review. [Aquaculture](#), v. 255, 55–75, 2006.

SANDOVAL JR, P.; TROMBETA, T. D.; MATTOS, B. O. Manual de criação de peixes em taques –rede . 2. Ed. Brasília: **Codevasf**, 2013. 36 p

SANTOS, P.N. Validação de metodologias para determinação de antimicrobianos em pescado por cromatografia líquida de alta eficiência. **Dissertação** (Mestrado em Química). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco, 2009.

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

SPUDEIT, D.A., DOLZAN, M.D.; MICKE, G.A. Conceitos básicos em eletroforese capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p 287-297, 2012.

TAVARES, G.C, LEAL, C.A.G; FIGUEIREDO, H.C.P. Antibioticoterapia em peixes. Sanidade em organismos aquáticos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. FEPMVZ, Belo Horizonte, cap. 6, 66-78, 2014.

TAVARES, M.F.M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Química Nova**, p.363-373, 2001.

TOURAKI, M.; LADOUKAKIS, M.; PROKOPIOU, C. High-performance liquid chromatographic determination of oxolinic acid and flumequine in the live fish fedd artemia. **Journal of Chromatography B**, v. 751, 247-56, 2001.

THOMPSON, M. et al. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**. v. 74, 835-855, 2002.

TOURAKI, M.; LADOUKAKIS, M.; PROKOPIOU, C. High-performance liquid chromatographic determination of oxolinic acid and flumequine in the live fish fedd artemia. **Journal of Chromatography B**, v. 751, p. 247-56, 2001.

WEINBERGER, R. Capillary zone electrophoresis. **Practical capillary electrophoresis**, 2^aed. New York: Academic Press, 2000. Cap. 2, p. 25-70.