



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
CARLOS AUGUSTO ALVARENGA DA MOTA JÚNIOR

**Estudos de eliminação residual de sulfadimetoxina e ormetoprima em
carne e pele de tilápia**

Ribeirão Preto
2020

CARLOS AUGUSTO ALVARENGA DA MOTA JÚNIOR

**Estudos de eliminação residual de sulfadimetoxina e ormetoprina em
carne e pele de tilápia**

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: Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 01/12/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2020

MOTA JUNIOR, C. A. A.	Estudos de eliminação residual de sulfadimetoxina e ormetoprima em carne e pele de tilápia		MESTRADO FCFRP USP 2020
--------------------------	---	--	-------------------------------

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.

Mota Junior, Carlos Augusto Alvarenga

Estudo de eliminação residual de sulfadimetoxina e ormetoprima em carne e pele de tilápia. Ribeirão Preto, 2020,
50 p.: il.; 30cm.

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. Sulfadimetoxina, Ormetoprima 2. Estudo de depleção 3. Período de carência, CLAE-EM/EM, QuEChERS.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Carlos Augusto Alvarenga da Mota Júnior

Título do trabalho: Estudo de eliminação residual de sulfadimetoxina e ormetoprima em carne e pele de tilápia.

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

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

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

Instituição: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____ Assinatura: _____

À minha mãe Susana

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Criador de tudo e de todos, pelo seu plano perfeito e amor eterno para com a humanidade.

À minha mãe Susana, por ser um ponto de referência reto e digno na minha vida. Fonte de toda inspiração, pela qual se justifica cada gota do meu suor.

Ao Professor Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal, por além de me orientar na vida acadêmica, me ensinar que é possível vencer os desafios e se tornar mais forte.

Ao Agnaldo, por toda sua dedicação e boa vontade.

Aos amigos de laboratório Marina, Juliana, Carol, João, Sarah, Pedro e Jonas pela ajuda diária, amizade, ensinamentos e cumplicidade.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP Jaboticabal pela disponibilidade do local para o experimento com os peixes. Em especial, pelo aluno Ignácio, que sacrificou seu descanso no feriado para me ajudar e orientar.

Aos professores Dr. Luis Maçao Sakamoto, Dra. Luciana Maria Saran e Dr. Wilson Roberto Malfará por serem parte fundamental do alicerce que me trouxe até aqui.

Aos farmacêuticos Tiago Couto Lima, Eliane Ishikawa Nakamura e Silvia Barioni Toma, assim como a empresa Ourofino Saúde Animal, por terem acreditado na minha capacidade profissional e colaborado com este trabalho.

À Coordenação do programa de Ciências Farmacêuticas, por toda a estrutura fornecida, pelo conhecimento disponibilizado e pela tolerância e paciência no momento em que mais precisei.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

***“Conheço as tuas obras: eu pus diante de ti
uma porta aberta, que ninguém pode fechar;
porque apesar de tua fraqueza, guardaste a
minha palavra e não renegaste o meu nome”***
Apocalipse 3,8

RESUMO

MOTA JUNIOR, C. A. A. **Estudos de eliminação residual de sulfadimetoxina e ormetoprima em carne e pele de tilápia.** Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Formas de alimentar a crescente população mundial se tornarão um dos maiores desafios para o futuro da humanidade. A aquicultura se desponta como uma importante alternativa para a solução deste problema, pois apresenta alta eficiência produtiva e baixo impacto ambiental. A produção mundial e nacional de pescados tem aumentado ao longo dos anos, porém, bacterioses causam enormes perdas e impactam negativamente no desenvolvimento deste tipo de cultura. A sulfadimetoxina (SDM) e a ormetoprima (OMP) são fármacos sinérgicos, ministrados concomitantemente, nas proporções de 5:1, com ação antimicrobiana e o seu uso na aquicultura já é autorizado pelo órgão regulamentador norte americano FDA (*Food and Drug Administration*), mas no Brasil, o uso destes fármacos para este fim, ainda não é autorizado. O fato de os peixes serem animais heterotérmicos torna necessário a realização de experimentos em condições ambientais locais para demonstrar que estas substâncias também são eficientes e seguras, se usadas nas condições climáticas nacionais. O presente projeto visou estimar um período de carência para o uso dos antimicrobianos SDM e OMP, nas proporções de 5:1, por meio de um experimento de depleção residual dos fármacos em filé de tilápia (fração do peixe com carne e pele em proporção natural). Para tanto, fez-se necessárias as seguintes etapas: (i) incorporar as duas substâncias na ração; (ii) desenvolver e validar métodos analíticos para a determinação de OMP e SDM na ração e no filé de tilápia, empregando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM); (iii) realizar ensaio com tilápias para avaliar a depleção residual dos fármacos no filé. Para incorporar os fármacos na ração, foi utilizado um revestimento à base de uma solução de gelatina, que por sua vez, demonstrou-se funcional, devido aos resultados encontrados nos testes de homogeneidade, fluvariabilidade e lixiviação. Foram desenvolvidos e validados dois métodos analíticos para determinação de OMP e SDM (um para a matriz ração e outro para a matriz filé). A etapa de extração para a ração baseou-se em um processo sólido-líquido simples e a do filé de tilápia pelo método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) modificado. Os métodos foram avaliados mediante os parâmetros recomendados nos compêndios oficiais e todos os resultados encontrados demonstraram-se dentro dos parâmetros especificados nos mesmos e sendo assim, considerados adequados aos fins que foram propostos. Para avaliar a depleção no filé de tilápia, os peixes receberam o fármaco via ração revestida por 5 dias consecutivos e as curvas de depleção residual de OMP e SDM se ajustaram ao modelo exponencial de primeira ordem. Tomando como referência o limite máximo de resíduo de 100 µg kg⁻¹ recomendado, o período de carência mínimo estimado para o abate dos peixes determinado por este estudo foi de 12 dias.

Palavras-chave: Sulfadimetoxina e Ormetoprima, período de carência, CLAE-EM/EM, aquicultura.

ABSTRACT

MOTA JUNIOR, C. A. A. Residual elimination studies of sulfadimethoxine and ormetoprim in tilapia meat and skin. Dissertation. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Ways to feed the growing world population become one of the biggest challenges for the future of humanity and aquaculture emerging as an important alternative in solving this problem, because it has high productive efficiency and low environmental impact. The fish national production has increased over the years and bacteriosis generate huge losses. Sulfadimethoxine (SDM) and Ormetoprima (OMP) are synergistic drugs concomitantly administered at 5:1 proportion with antimicrobial action and their use in aquaculture is already regulated by the US Food and Drug Administration (FDA). However, in Brazil, the use of these drugs for this purpose is not yet legalized. Fish are heterothermal animals, and this fact, makes it necessary to conduct experiments under local environmental conditions to demonstrate that these drugs are also efficient and safe if used under national climatic conditions. The aim of this project was to estimate a withdrawal period for SDM and OMP antimicrobials in a tilapia fillet and it was through a residual depletion experiment (fraction of fish with meat and skin in natural proportion). Therefore, the following steps were necessary: (i) incorporate the two drugs in the fish feed; (ii) develop and validate two analytical methods for the OMP and SDM determination in the feed and fillet, using high performance liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS/MS); (iii) perform a tilapia assay to evaluate residual drug depletion in the fillet. To incorporate the drugs in the diet, one was based on a gelatin solution, which in turn proved to be functional due to the results found in the homogeneity, buoyancy and leaching tests. Two analytical methods were developed and validated for the determination of OMP and SDM (one for the feed matrix and one for the fillet matrix). OMP and SDM drugs were extracted from the feed by simple solid-liquid process and tilapia fillet by the modified QuEChERS method. The methods were evaluated according to the parameters recommended in the official compendia and all the results found were within the parameters specified in them and, thus, they were adequate for the purposes that were proposed. To assess depletion in tilapia fillet, fish received the drug via coated feed for 5 consecutive days and the residual depletion curves of OMP and SDM fitted to the first-order exponential model. Taking as reference the recommended maximum residue limit of 100 µg / kg, the minimum grace period for fish slaughter, considering the experimental conditions was 12 days

Keywords: Sulfadimethoxine and Ormetoprima, withdraw period, LC-MS MS, aquaculture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gráfico demonstrando o crescimento da produção de pescados em cativeiro e a estagnação da produção de pescados por captura.	2
Figura 2 – Representação 2D da molécula de Ometoprima	5
Figura 3 - Representação 2D da molécula de Sulfadimetoxina	5
Figura 4 - Suspensão de SDM e OMP em solução de gelatina	12
Figura 5 - Processo de secagem da ração após revestimento.	12
Figura 6 – Método de extração utilizado para determinar SDM e OMP em ração para peixes.....	14
Figura 7 – Método de extração utilizado no método analítico para determinar SDM e OMP no filé de tilápia	15
Figura 8 – Cromatograma obtido após leitura dos padrões SDM + OMP + SMZ utilizando o método ajustado para o sistema CLAE-EM/EM	23
Figura 9 - Cromatogramas Teste de Seletividade - Método Ração.....	24
Figura 10 - Gráfico de resíduos SDM - Método Ração.....	26
Figura 11 - Gráfico de resíduos SDM - Método Ração.....	27
Figura 12 – Cromatograma obtido durante o teste de robustez com a fase móvel sendo confeccionada com -1% de MeOH	29
Figura 13 Cromatograma obtido durante o teste de robustez com a fase móvel sendo confeccionada com +1% de MeOH.....	29
Figura 14 - Lotes produzidos com o processo de incorporação proposto neste estudo.	33
Figura 15 - Comparativo entre o método de extração inicial e o método ajustado.....	35
Figura 16–Gráfico do perfil de depleção residual de OMP e SDM.....	41
Figura 17- Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual considerando a soma dos resíduos de OMP e SDM:	41
Figura 18 - Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais parâmetros utilizados na configuração do espectrômetro de massas.	14
Tabela 2 - critérios de aprovação, segundo o guia VICH-FDA (2015).	20
Tabela 3 – Comparação dos métodos analíticos	23
Tabela 4 – resultados obtidos no teste estatístico T de Student aplicados nos resultados obtidos no ensaio de verificação do efeito da matriz sob os analitos	25
Tabela 5 – Curvas de calibração obtidas durante o experimento de linearidade	25
Tabela 6 - Teste F para variancias SDM - Método Ração	27
Tabela 7 – Teste F para variâncias OMP – Método Ração.....	27
<i>Tabela 8 - Resultados obtidos para os ensaios de Veracidade / Recuperação para injeções no mesmo dia.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabela 9 - Resultados obtidos para os ensaios de Veracidade / Recuperação para injeções em dias diferentes.....</i>	<i>28</i>
Tabela 10 - Resultados obtidos no ensaio de verificação da qualidade da ração incorporada, para a substância Ormetoprima.	32
Tabela 11- Resultados obtidos no ensaio de verificação da qualidade da ração incorporada para a substância Sulfadimetoxina.....	32
Tabela 12 – Curvas de calibração obtidas durante o experimento de linearidade para a validação do método de determinação de SDM e OMP no filé da tilápia.	35
Tabela 13 – Gráficos de resíduos obtidos durante o experimento de linearidade.	36
Tabela 16 – Resultados obtidos durante o ensaios de exatidão e precisão para analito OMP.....	38
Tabela 17 - Resultados obtidos durante o ensaios de exatidão e precisão para analito OMP	38
Tabela 18 - Resultados analíticos das amostras de filé (carne + pele) de tilápia.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ESI	Ionização por Eletronebulização
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação
FDA	Agência Americana de Drogas e Alimentos
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
LMR	Limite Máximo de Resíduos
MAPA	Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento
PI	Padrão Interno
PSA	Amina Primária e Secundária
QuEChERS	Rápido, Fácil, Efetivo, Robusto, Seguro
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1. Equipamentos e acessórios	8
3.2. Reagentes e solventes.....	9
3.3. Soluções-padrão	10
3.4. Ração comercial	10
3.5. Amostras branco de filé	10
3.6. Incorporação dos fármacos na ração.....	11
3.7. Ensaio de lixiviação.....	13
3.8. Métodos Analíticos.....	13
3.8.1. Extração dos fármacos da ração.....	13
3.8.2. Configuração do sistema CLAE-EM/EM para análise em ração	14
3.8.3. Extração dos fármacos no filé de tilápia.....	15
3.8.4. Configuração do sistema CLAE-EM/EM para análise em filé de tilápia.	15
3.8.5. Validação analítica	16
3.8.5.1. Validação do método de quantificação dos analitos na ração medicada	16
3.8.5.2. Validação do método de quantificação dos analitos no filé de tilápia.	18
3.9. Estudo de depleção residual e estimativa de período de carência	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Método analítico para análise na ração	22
4.1.1 Validação do método analítico para análise na ração.....	24
4.2. Ensaio de lixiviação.....	30
4.3. Incorporação do fármaco à ração	31
4.4. Método analítico para análise no filé.....	33
4.4.1 Validação analítica	35

4.5. Avaliação dos resultados de depleção residual de sulfadimetoxina e ormetoprima em filés de tilápia	38
5. CONCLUSÕES	45
6. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

Entre 10 e 12 mil anos atrás, a era glacial chegou ao fim. Nesse mesmo período de tempo, os territórios do Egito e da Mesopotâmia, considerados berços da civilização, desenvolveram a agricultura, que por sua vez se espalhou para o mundo. Tal fato recebeu o nome de Revolução Neolítica e marcou a transição da economia de apropriação para a de produção, onde as plantas e animais começaram a ser domesticados e criados ou cultivados pelo homem. Consequentemente, surgiram as cidades e um massivo crescimento da população mundial foi desencadeado¹. Desde então, as atividades agropecuárias e seus avanços foram fundamentais para a evolução da civilização aos moldes que a conhecemos hoje².

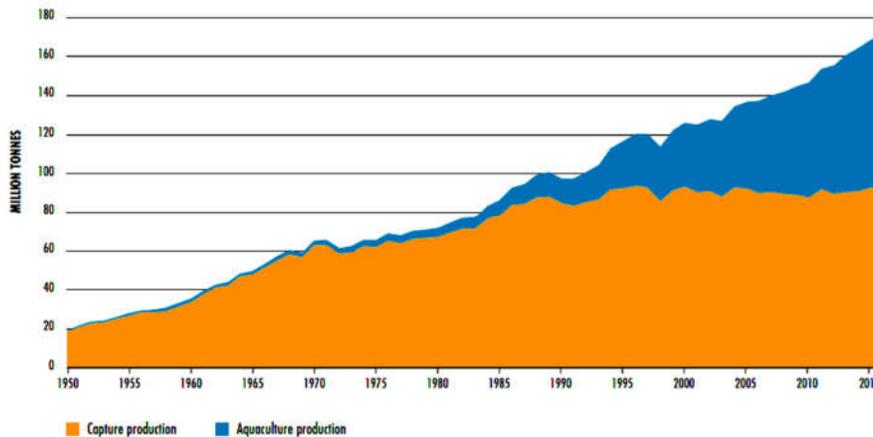
Estima-se que em 2050 a população mundial será maior que nove bilhões de indivíduos e como alimentar todas essas pessoas se tornará um grande desafio³, fazendo-se indispensável o uso otimizado de novas tecnologias para que, além de suprir a demanda nutricional, a produção dos alimentos ocorra de forma eficiente, sustentável e a mais inócua possível ao meio ambiente, evitando exaurir os recursos naturais e um possível colapso do sistema produtivo^{2,3}.

A aquicultura surge como uma importante opção à demanda nutricional mundial^{2,3,4}, pois tem elevada produtividade e alto valor nutritivo. Segundo um estudo mercadológico publicado pelo Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE)⁵, considerando um mesmo hectare de terra, pode-se produzir em uma safra: 2,5 toneladas de carne bovina ou 3 toneladas de milho ou 80 toneladas de cana de açúcar ou 150 toneladas de peixes. O consumo consuntivo da água na aquicultura é de apenas 10%, considerado baixo, quando comparado à irrigação das lavouras que é de 90%⁴.

No cenário econômico atual, a aquicultura está em franca expansão. Em 2011, foram produzidas 154 milhões de toneladas de pescados no mundo todo, sendo 92,2 milhões de toneladas provenientes da captura do pescado e 61,8 milhões de toneladas produzidos em cativeiro. Já em 2016, a produção saltou para um total de 170,9 milhões de toneladas, sendo 90,9 milhões de toneladas advindos da captura do pescado e 80,0 milhões de toneladas produzidos pela aquicultura. Em 5 anos, houve aumento de 29% na aquicultura, enquanto na pesca por captura houve um decréscimo 1%, ilustrando que a produção mundial

de pescados tem crescido em função do aumento da produção por aquicultura.² O gráfico abaixo Figura 1 ilustra o fato exposto:

Figura 1 – Gráfico demonstrando o crescimento da produção de pescados em cativeiro (em azul) e a estagnação da produção de pescados por captura (em amarelo).



Fonte: Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018).

O Brasil tem alto potencial produtivo para a aquicultura, pois tem 90% do seu território em regiões climáticas tropicais (o que favorece a criação de várias espécies) e retém 13,8% do total das águas doces superficiais do planeta, 34,9% do total das Américas e 56,9% da América do Sul. Os reservatórios públicos e privados representam um montante de 8,5 milhões de hectares e o país também é autossuficiente na produção de grãos (matéria prima essencial para a produção da ração utilizada na nutrição dos peixes)⁷. Nesta área, ainda há muito potencial para ser explorado no país, pois apesar do favorecimento climático e abundância dos recursos, em 2016, o Brasil foi apenas o décimo terceiro maior produtor mundial de peixes em águas continentais, ficando atrás de países como Uganda, Nigéria, Congo e Mianmar, que por sua vez possuem um menor potencial natural/econômico para esta atividade².

Apesar do baixo aproveitamento do potencial natural para a aquicultura, a produção nacional de pescados vem aumentando ao longo dos anos. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção total de pescados no Brasil aumentou de 476 milhões toneladas produzidas em 2014 para 575 milhões de toneladas em 2018, representando um aumento aproximado de 21% em quatro anos. Em valores monetários, o total de 2,7

bilhões de reais gerados pela aquicultura em 2014, saltou para 4,9 bilhões de reais em 2018, representando um aumento de 81,5% no período. O destaque foi a produção da Tilápia, com um total de 312 milhões de toneladas produzidas em 2018. Em âmbito econômico, a produção de Tilápia também foi a que mais se destacou, representando um total de 54% de todo o valor da produção nacional⁸.

Tilápia é um nome popular para definir um grupo de peixes ciclídeos, oriundos da África. São conhecidas como “frangos das águas”, pelo seu rápido crescimento, domesticabilidade e, inicialmente, consideravam-se mais resistentes às doenças que outras espécies. Porém, o sistema intensivo de criação, dependência de alimentos formulados (ração), intensificação do manuseio e problemas na qualidade da água, favoreceram a multiplicação de bactérias que antes eram inofensivas e agora passaram a provocar doenças⁹.

Doenças bacterianas têm sido o principal obstáculo para o desenvolvimento da cultura da tilápia¹¹, resultando em perdas parciais ou até mesmo totais da safra^{12, 13}. Entre as bactérias mais comuns, estão: *Streptococcus sp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*^{10,14,15}. A estreptococose é a doença provocada pelas bactérias do gênero *Streptococcus sp.*, podendo ser causada por diversos subtipos da bactéria, entre elas, o *S. agalactiae*, mais frequente no mundo, *S. dysgalactiae* e *Streptococcus iniae*^{14,15,16}. Os sintomas clínicos mais comuns da doença são: natação espiralada (em função da encefalite instalada), corpo escurecido e de aspecto curvado em “s”, olhos opacos e saltados. Internamente, é verificado acúmulo de líquido hemorrágico na cavidade abdominal, esplenomegalia e fígado pálido. A confirmação da doença é feita através da cultura e identificação da bactéria a partir do rim e do cérebro. O contágio é feito através das bactérias eliminadas nas fezes pelos peixes doentes, que por sua vez entram em contato com os peixes saudáveis, infectando-os. A *Aeromonas hydrophila* é um bastonete móvel gram-negativo amplamente distribuído em ambientes aquáticos e causa septicemia hemorrágica em peixes, incluindo a tilápia do Rio Nilo. Os sintomas apresentados são: lesões superficiais, feridas vermelhas e ulcerações. Internamente, pode haver pontos de necrose, anemia, acúmulo de líquido ascítico, lesões no fígado e rins.

Antimicrobianos são regularmente ministrados às criações de pescados a fim de diminuir as perdas causadas por bacterioses^{17,18,19}. Porém, no mercado

nacional, o número de medicamentos disponíveis para realizar o tratamento de doenças que acometem os pescados é muito pequeno, quando comparados aos disponíveis para outras criações (gado, frango, suíno). Há à disposição dos aquicultores medicamentos à base de oxitetraciclina, cloranfenicol e tricorfon.

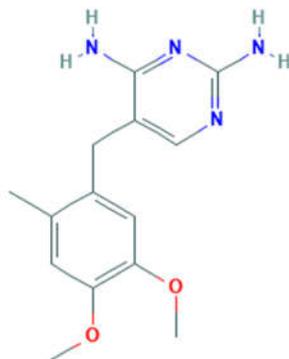
O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão regulamentador responsável pelo registro de novos produtos veterinários. Pela legislação vigente, esses medicamentos são caracterizados como “produtos veterinários”. Para obter a licença de produção de novos produtos veterinários no mercado nacional, a empresa candidata deve comprovar a eficácia do produto para aquela espécie animal, contra as doenças a qual esse produto se destina. Além disso, a empresa também deve demonstrar que o uso do novo produto é seguro para o consumidor final. Esse processo é burocrático e exige altos investimentos para ser concluído, sendo assim, diminui a viabilidade mercadológica do novo produto veterinário e conseqüentemente, o interesse das empresas. Outra consequência relacionada à pequena oferta de medicamentos regulamentados é o uso ilegal e indiscriminado de medicamentos cuja sua eficiência e segurança são desconhecidas nas condições climáticas nacionais.

Nos Estados Unidos, há alguns medicamentos disponíveis para tratar doenças que acometem os pescados criados em cativeiro, entre eles, o *Romet-30*[®], que contem as substâncias ativas sulfadimetoxina (SDM) e ormetoprima (OMP), nas proporções de cinco partes para uma, respectivamente (Figuras 2 e 3). A combinação dessas duas substâncias tem efeito antimicrobiano sinérgico e é amplamente utilizada na aquicultura em outros países²¹, porém no Brasil ainda não são registradas. O desenvolvedor do medicamento, PharmaQ, também verificou em testes *in vitro* que a SDM em conjunto com a OMP demonstra alta atividade antimicrobiana em culturas de células de tilápias infectadas por *Streptococcus sp.*, apresentado fortes indícios de sucesso para o futuro uso desse medicamento no tratamento de estreptococoses em tilápias²².

Apesar de sinérgicos, estes fármacos apresentam características químicas diferentes. A SDM apresenta a polaridade mais baixa que a OMP, aumentando o desafio para o desenvolvimento de métodos de incorporação dessas substâncias em ração para uso na aquicultura, uma vez que a OMP tende a lixiviar para a água com mais facilidade. As Figura 2 e 3 trazem as

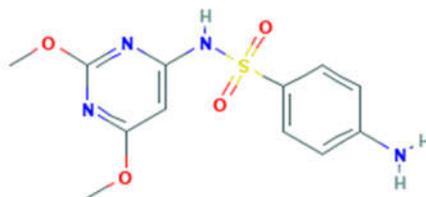
representações 2D de ambas as substâncias e alguns dados literários importantes:

Figura 2 – Representação 2D da molécula de Ometopríma, CAS Number: 6981-18-6, Fórmula Molecular: $C_{14}H_{18}N_4O_2$, peso molecular: 274.32 g/mol, Solubilidade em água: 1,540 mg mL⁻¹.⁴²



Fonte: U.S. National Library of Medicine – NIH (2020).

Figura 3 - Representação 2D da molécula de Sulfadimetoxina, CAS Number: 122-11-2, fórmula molecular: $C_{12}H_{14}N_4O_4S$, peso molecular: 310.33 g/mol, solubilidade em água: 0,343 mg mL⁻¹.⁴³

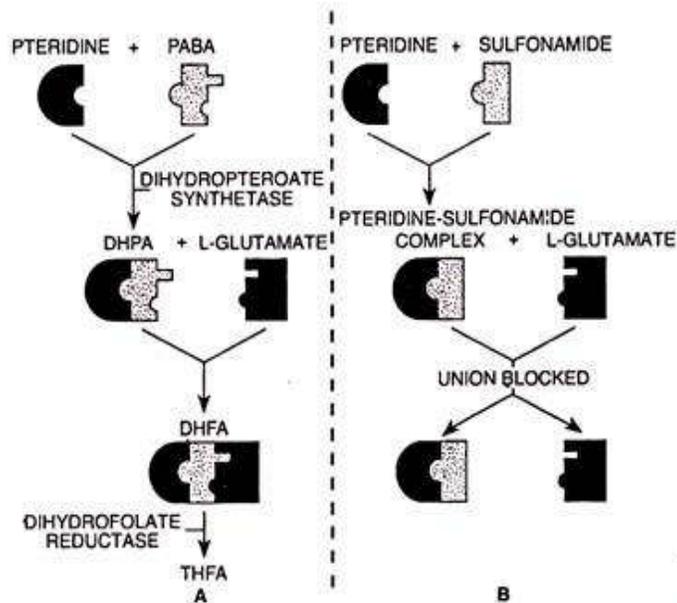


Fonte: U.S. National Library of Medicine - NIH. (2020).

As sulfonamidas, grupo de antibióticos em que a sulfadimetoxina está incluída, são análogos ao ácido *p*-aminobenzóico (PABA) e sua ação antimicrobiana está relacionada com a inibição competitiva da conversão de PABA em ácido fólico, impedindo a síntese do ácido fólico, que por sua vez, é essencial para crescimento bacteriano. A ormetopríma (OMP) tem efeito sinérgico com a sulfadimetoxina, pois potencializa o efeito anti-folato das

sulfonamidas através da inibição competitiva da dihidrofolato redutase.^{23,24,25} O quadro 1 ilustra a síntese de ácido fólico realizado pelas bactérias e o mecanismo de ação das sulfonamidas:

Quadro 1 - Mecanismo de ação das sulfonamidas, onde: A) Síntese do ácido fólico e B) Mecanismo de ação das sulfonamidas.



Fonte: <http://www.biologydiscussion.com/medical-microbiology/sulfa-drugs-discovery-structure-and-effectiveness-antibiotics/55893>

Apesar de grandes aliados, os antimicrobianos usados na aquicultura, assim como em qualquer outra cultura destinada à produção de alimentos para o consumo humano, geram preocupações, entre as mais importantes estão: resistência bacteriana, contaminação dos reservatórios de água e a presença de resíduos do medicamento no produto final destinado ao consumo.^{26,27} Para limitar a exposição humana às substâncias utilizadas para o tratamento de doenças durante o período de criação dos animais, agências reguladoras, como a Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency - EMA*) e a Agência para Administração de Drogas e Alimentos (*Food and Drug Administration – FDA*) dos Estados Unidos, têm estabelecido os chamados Limites Máximos de Resíduos (LMR) para os fármacos veterinários aprovados para uso em animais destinados à produção de alimentos^{28,29}, visando promover maior segurança quanto ao consumo de produtos oriundos de animais

previamente tratado com antimicrobianos. Os limites estabelecidos tanto para OMP como para SMD são o mesmo, qual seja, 100 ng g^{-1} ^{30,31}.

Para almejar a aprovação do uso de SDM e OMP na aquicultura nacional, é de fundamental importância a existência de dados científicos demonstrando que os alimentos provenientes de animais tratados por estas substâncias não apresentem concentrações residuais acima do permitido⁴⁵.

Sendo assim, tendo em vista o fato de a tilápia ser a espécie mais produzida no Brasil, os grandes impactos econômicos negativos gerados pelas infecções bacterianas, o potencial para o uso de sulfadimetoxina e ormetoprima no combate de bactérias que afligem essa espécie, as exigências de segurança dos órgãos regulatórios e o grande potencial brasileiro para a aquicultura, estudos de depleção residual de SDM e OMP em tilápias produzidas em condições climáticas regionais, bem como, a estimativa do período de carência mínimo a ser respeitado, considerando os LMR estabelecidos para esses fármacos, fazem-se fundamentais para uma possível regulamentação desses fármacos no cenário nacional³².

Além disso, prover um procedimento de incorporação dos fármacos na ração, de forma a manter-se a proporção desejada entre eles, sem que haja perdas significativas por lixiviação dos fármacos para a água, constitui-se num desafio a parte.

Tendo em vista os fatos expostos, o presente estudo foi realizado para estimar um período de carência mínimo a ser recomendado ao produtor aquícola, considerando os parâmetros de segurança alimentar.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal, realizar um estudo de eliminação residual das substâncias Sulfadimetoxina e Ormetoprima em filé (carne e pele em proporções naturais) de tilápia, sob condições climáticas nacionais de criação, além de estimar um período de carência mínimo a ser recomendado. Para tanto, fizeram-se necessários as seguintes etapas:

- a) Desenvolvimento de método para incorporar as duas substâncias na ração que será oferecida ao peixe durante o experimento. O

procedimento tem como prerrogativa, manter os fármacos nas proporções de 5:1, com concentração homogênea nos pellets de ração e com reduzido risco de lixiviação para a água.

- b) Desenvolvimento de método analítico para determinação de OMP e SDM na ração medicada, de forma que atenda os parâmetros de validação preconizados no “Guia de validação e controle da qualidade: fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários”, emitido pelo MAPA.³⁸
- c) Realização do controle da qualidade da ração medicada produzida para o experimento, por meio de testes de lixiviação, homogeneidade e teores de SDM e OMP.
- d) Desenvolvimento de método analítico para determinação de OMP e SDM no filé da tilápia, de forma que atenda os parâmetros de preconizados no “*Guidance for Industry Studies to Evaluate the Metabolism and Residue Kinetics of Veterinary Drugs in Food-Producing Animals: Validation of Analytical Methods Used in Residue Depletion Studies*”.³⁹
- e) Realização do estudo experimental de depleção residual com tilápia, utilizando a ração medicada produzida.
- f) Análise estatística dos dados obtidos no estudo experimental de depleção residual e determinação do período de carência.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos e acessórios

Durante o procedimento analítico e o processo de extração dos analitos do filé de peixe e da ração, foram utilizados os seguintes equipamentos: processador de alimentos (Walita, São Paulo, Brasil), agitador vortex AP56 (Phoenix, São Paulo, Brasil), centrífuga refrigerada Himac CF5RX (Hitashi, Tóquio, Japão) e um banho de ultrassom Maxiclean modelo USC-1450 (Unique, São Paulo, Brasil).

Os padrões analíticos foram pesados na balança analítica Shimadzu AUW220D (Shimadzu, Kyoto, Japão), as amostras (carne e ração) e os

reagentes usados na extração/limpeza foram pesados na balança analítica Marte AL 200C (Marte científica, São Paulo, Brasil).

As análises quantitativas e os testes de validação dos métodos analíticos foram realizados em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM). O sistema cromatográfico utilizado foi fornecido pela Shimadzu (Kyoto, Japão), sendo constituído por duas bombas LC10AD, um sistema controlador modelo SLC 10A, um forno modelo CTO 10AS e um injetor automático modelo SIL-20A. O espectrômetro de massas utilizado foi um triplo quadrupolo (Quatro LC, Micromass, Manchester, UK), sendo o *Electrospray* (ESI) a fonte de ionização, operado em modo positivo. A aquisição e processamento dos dados ocorreu através do software Micromass MassLynx, versão 4.1.

Por meio do sistema Milli-Q (Direct-Q 3, Merck Millipore, Alemanha) obteve-se a água deionizada, que foi empregada no preparo de todas as soluções aquosas utilizadas no procedimento analítico e limpeza das vidrarias, após lavagem.

3.2. Reagentes e solventes

No processo de extração dos analitos no filé e na ração foi utilizado metanol grau cromatográfico (JT Baker, México). Os reagentes padrões: Ormetoprima (99%, Dr. Ehrenstorfer, Alemanha), Sulfadimetoxina ($\geq 99,0\%$, Sigma Aldrich, EUA), e Sulfametoxazol ($\geq 99,0\%$, Sigma Aldrich, EUA), foram utilizados no preparo da solução padrão e todos solubilizados em metanol. Para a incorporação do medicamento na ração foi empregada gelatina sem sabor Royal (Pedreira – SP). Para a etapa de limpeza do extrato, utilizou-se o sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$) da marca Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil), amina primária-secundária (PSA) da marca Agilent Technologies (Estados Unidos). Durante o experimento com os animais foi utilizado benzocaína P.A. da marca Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil) para anestésiar os mesmos.

Na composição da fase móvel, utilizou-se água e ácido fórmico grau CLAE (Merck, EUA), além de acetonitrila grau CLAE (JT Baker, México) acidificada com ácido fórmico (0,5%) para o método analítico do filé e metanol acidificado com ácido fórmico (0,5%) para o método analítico da ração.

Antes da injeção no sistema CLAE-EM/EM, todas as soluções e extratos foram filtrados com membrana de celulose regenerada (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha) com 0,20 μm de tamanho de poro e com 25 mm de diâmetro.

3.3. Soluções-padrão

Utilizando os reagentes padrões de SDM, OMP e sulfametoxazol (SMZ, empregado como padrão interno) foram preparadas soluções estoques individuais em balões de 50 mL, na concentração de 1,0 mg mL⁻¹, diluídos em metanol.

As soluções estoques foram armazenadas em frascos âmbar, mantidas à -20 °C, e foram utilizadas por um período não superior a um mês.

As soluções de trabalho foram preparadas conforme demanda do estudo, para uso diário, contendo a mistura de SDM e OMP. Para o método analítico da ração, as concentrações das soluções de trabalho estavam na faixa de concentração de 1,0 – 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para SDM e 0,2 – 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para OMP, diluídas em uma solução contendo 0,5% de ácido fórmico em água e 0,5% de ácido fórmico em metanol, respectivamente, nas proporções de: 55:45. Para o método analítico do filé, foi feita uma solução intermediária contendo uma mistura de SDM e OMP e a partir dela, foram realizadas as fortificações das matrizes branco, na faixa de: 20 - 260 ng g⁻¹.

3.4. Ração comercial

Foi adquirida, na cidade de Cravinhos-SP, a ração Pirá Crescimento, fabricada pela Guabi Saúde e Alimentação Animal (Sales de Oliveira, SP). A composição nutricional está disponível no sítio eletrônico: <http://www.guabi.com.br/produto/pira-crescimento/>. (acessado em Janeiro de 2020).

3.5. Amostras branco de filé

As matrizes “branco” (amostras isentas dos analitos) de filé de tilápia foram adquiridas em três peixarias distintas localizadas na região central de Ribeirão Preto (Brasil). A carne da tilápia, com sua pele, em proporções naturais, proveniente de todas as peixarias, foram homogeneizadas e trituradas com

auxílio do processador de alimentos. O total dessa mistura foi dividido em alíquotas de aproximadamente 1g, que posteriormente foram congeladas em freezer (-20°C) até a sua utilização. A ausência de SDM e OMP foi confirmada através do método analítico desenvolvido.

3.6. Incorporação dos fármacos na ração

Dentre as formas possíveis de ministrar medicamentos aos peixes, optou-se por administrar o medicamento via ração, pela facilidade e rapidez no manejo e o menor nível de stress causado aos peixes durante o procedimento, e pelo fato de consistir na principal via de administração de medicamentos utilizada nesta atividade. Porém, utilizando-se desta via, há a possibilidade de o fármaco lixiviar para a água do criadouro, podendo contaminá-la e promover o desenvolvimento de resistência às bactérias que ali estão. O método de incorporação da ração foi baseado nas informações fornecidas pelo fabricante do medicamento Romet-30²², visando manter as proporções sinérgicas pré-definidas entre os fármacos e evitando a ocorrência de lixiviação para a água.

Neste sentido, a solução de gelatina foi selecionada como polímero para compor o processo de incorporação dos fármacos na ração por consistir em um material de fácil acesso e constar nas recomendações do fabricante do produto Romet-30.

A concentração teórica alvo foi de: 4,17 mg/g de SDM e 0,83 mg/g de OMP, totalizando 5mg de SDM + OMP (5:1) por grama de ração. Também foi considerado que seria ofertado aos peixes 10g de ração por dia / kg de massa corporal, totalizando 50mg (SDM + OMP) por kg de massa corporal, por dia.

O método consistiu em preparar uma pasta constituída por 25 mL de solução aquosa (contendo 5% de gelatina) e 1,60 g das substâncias ativas nas proporções de 5:1 (SDM:OMP). Os 25 mL da pasta gelatinosa contendo os fármacos foram adicionados a 250 g de ração, seguidos de agitação mecânica, com auxílio de um bastão de vidro. Aguardou-se a secagem desse material por 2 horas, com leve agitação a cada 10 minutos (para evitar que os pellets de ração unissem entre si). É importante mencionar que um excedente de 1,4 mg das substâncias ativas foi adicionado a cada grama de ração preparada, a fim de compensar as perdas oriundas ao processo de incorporação.

Após incorporar as substâncias ativas à ração, fez-se necessário checar se as concentrações destas, bem como a proporção pretendida entre elas (5:1), se mantiveram constantes durante o procedimento. Para tanto, foram retiradas três porções distintas da ração incorporada, as quais foram trituradas em graus separados. Posteriormente, triplicatas de cada porção foram submetidas ao processo de extração e quantificadas mediante o emprego do método analítico validado. Todos os resultados encontrados foram relacionados entre si e verificou-se a variação entre eles através do desvio padrão relativo (% CV). A média dos teores foi comparada com o valor teórico de cada ativo contido na ração, a fim de avaliar as eventuais perdas durante o processo de incorporação dos fármacos. As figuras 4 e 5 trazem registros fotográficos realizados durante o processo de incorporação.

Figura 4 - Suspensão de SDM e OMP em solução de gelatina



Figura 5 - Processo de secagem da ração após revestimento.



3.7. Ensaio de lixiviação

Soares Jr (2004)⁴⁰ descreve um método para avaliar a eventual perda de fármacos incorporados à ração para água, sobre a qual se embasou os testes realizados. O procedimento consistiu em pesar 1 g de ração incorporada com os fármacos em béquer contendo 900 mL de água destilada, cuja temperatura e pH foram monitorados. Os béqueres foram submetidos à branda agitação, com auxílio de agitador magnético.

Foram realizadas coletas de 10 mL da água do béquer nos tempos de 5, 10 e 15 minutos decorridos da adição da ração na água. A cada momento de coleta, 10 mL de água foram adicionados no béquer, visando manter o volume inicial de 900 mL. A cada alíquota de 10 mL coletados, foram adicionados 100 µL de ácido fórmico e, em seguida, a solução foi filtrada em membrana de celulose regenerada, com porosidade de 0,20 µm de diâmetro. A alíquota de 5µL do filtrado foi injetada no sistema CLAE-EM/EM.

É importante mencionar que a concentração máxima possível de SDM no béquer é de 3,75 µg mL⁻¹ e de OMP é de 0,75 µg mL⁻¹. Ambos os valores estão muito abaixo da solubilidade de cada substância na água (343 µg mL⁻¹ para SDM e 1540 µg mL⁻¹ para OMP), sendo assim, a solubilidade não foi um fator que comprometeu a determinação de ambas as substâncias.

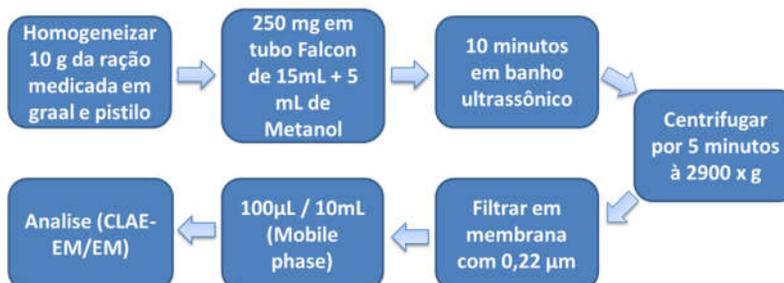
3.8. Métodos Analíticos

3.8.1. Extração dos fármacos da ração

Inicialmente, cerca de 10 g de ração foram triturados com auxílio de gral e pistilo. Uma alíquota de 250 mg desse material triturado e homogeneizado foi colocado em tubo falcon de 15mL. Em seguida, adicionaram-se 5 mL de metanol e submeteu-se a mistura a banho ultrassônico de 10 minutos. Depois, centrifugou-se o material por 5 minutos a 2900 x g, sob temperatura ambiente. Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi diluída em 10 mL (q.s.p.) de fase móvel. Dessa solução, 2 mL foram coletados e filtrados em membrana de 0,20 µm e, posteriormente, 5 µL do filtrado foi injetado no sistema CLAE-EM/EM.

Abaixo, na Figura 6, está o fluxograma ilustrando o procedimento de extração adaptado para o método analítico de determinação de SDM e OMP em ração para peixes.

Figura 6 – Método de extração utilizado para determinar SDM e OMP em ração para peixes.



3.8.2. Configuração do sistema CLAE-EM/EM para análise em ração

A fase estacionária utilizada na separação cromatográfica foi a coluna analítica de fase reversa X-Terra MS C18, 3,9 mm x 100 mm x 3,5 µm. A fase móvel consistiu em (A) 0,5% de ácido fórmico em água ultrapura e (B) 0,5% de ácido fórmico em metanol, respectivamente nas proporções de 55:45 (v/v), em modo isocrático. A temperatura do forno foi mantida em 25 °C.

A fonte de ionização foi mantida a 100°C e a temperatura do gás de dessolvatação em 350°C. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e dessolvatação nas vazões de 75 L h⁻¹ e 471 L h⁻¹, respectivamente. O argônio foi usado como gás de colisão. Pelo modo de monitoramento de reações selecionadas (MRM) dos íons das moléculas protonadas [M+H]⁺ e seus respectivos fragmentos. A Tabela 1 descreve as transições selecionadas, os valores escolhidos para a voltagem do cone e a energia de colisão:

Tabela 1 - Principais parâmetros utilizados na configuração do espectrômetro de massas.

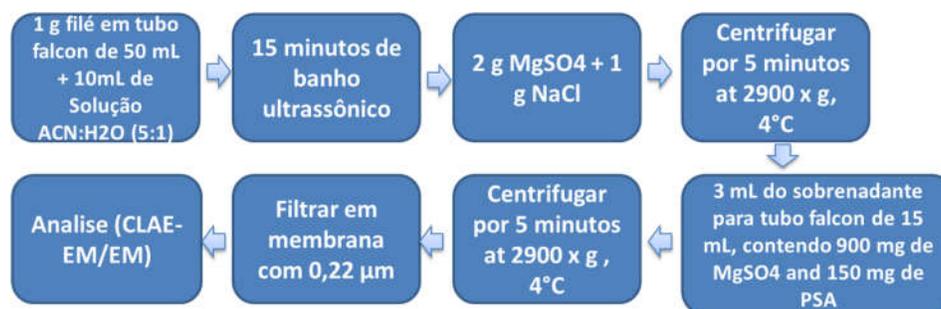
Substância	Transições Selecionadas	Voltagem do Cone	Energia de Colisão
SDM	311>156 - Quantificação	28.0 eV	20.0 eV
	311>245 - Identificação	28.0 eV	18.0 eV
OMP	275>259 - Quantificação	35.0 eV	25.0 eV
	275>123 - Identificação	35.0 eV	23.0 eV
SMZ	254>156 - Quantificação	20.0 eV	22.0 eV
	254> 98 - Identificação	20.0 eV	27.0 eV

3.8.3. Extração dos fármacos no filé de tilápia

O método de extração das substâncias ativas presentes no filé (carne e pele em proporções naturais) do peixe foi baseado no método proposto por Phu et al. (2015)⁴⁴. O método de extração utiliza procedimento do tipo QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) e foi simplificado e ajustado à proposta do projeto.

O método consistiu em pesar 1 g de filé em tubo falcon de 50 mL, adicionar 10 mL de uma solução 5:1 (ACN:H₂O) e submeter essa mistura a banho ultrassônico por 15 minutos. Após banho ultrassônico, adicionaram-se 2 g de MgSO₄ e 1 g de NaCl no tubo e promoveu-se a agitação em vortex por 1 minuto seguido de centrifugação por 6 minutos a 2900 g, em 4°C. Em seguida, 3 mL do sobrenadante para tubo falcon de 15 mL contendo 900 mg de MgSO₄ e 150 mg de PSA. O tubo foi submetido à centrifugação por 6 minutos a 2900g, em 4°C. Uma alíquota do sobrenadante foi coletada e filtrada em membrana regenerada de celulose 0,20 µm e, posteriormente, 10 µL do filtrado foram injetados no sistema CLAE-EM/EM. A Figura 7 ilustra as etapas do processo de extração :

Figura 7 – Método de extração utilizado para determinar SDM e OMP no filé de tilápia.



3.8.4. Configuração do sistema CLAE-EM/EM para análise em filé de tilápia.

A fase estacionária utilizada na separação cromatográfica foi a coluna analítica de fase reversa X-Terra MS C18, 3,9 mm x 100 mm x 3,5 µm (Lote 227, Waters, EUA). A fase móvel consistiu em (A) 0,5% de ácido fórmico em água e (B) 0,5% de ácido fórmico em ACN, respectivamente nas proporções de 55:45 (v/v). A temperatura do forno foi mantida em 25 °C.

As configurações da fonte de ionização e do EM foram iguais àquelas descritas para as análises em ração, com a diferença de que a fonte de ionização foi mantida à temperatura de 90°C e a temperatura do gás de dessolvatação em 400°C.

3.8.5. Validação analítica

Após terem sido estabelecidas as condições analíticas para determinar SDM e OMP em ambas as matrizes (filé e ração), procedeu-se a avaliação do desempenho analítico de ambos os métodos.

3.8.5.1. Validação do método de quantificação dos analitos na ração medicada

Os ensaios foram executados tomando-se como referência o “Guia de validação e controle de qualidade: fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários”³⁷, expedido pelo MAPA. Abaixo está descrito como foram realizados os testes:

- a) **Seletividade:** A seletividade do método foi avaliada comparando os cromatogramas obtidos em 2 injeções do diluente final da amostra (fase móvel), 2 injeções da matriz branco após sofrer todo o processo de extração, 2 injeções dos analitos preparados em solução, 2 injeções da matriz branco fortificada com os analitos.

- b) **Efeito da Matriz:** A avaliação do efeito da matriz sobre os resultados analíticos foi realizada construindo, inicialmente, uma curva analítica de cinco pontos, utilizando soluções dos analitos puros, diluídos em solvente, nas concentrações de OMP: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e SMD: 1,0, 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em seguida, preparou-se 2 grupos contendo 18 amostras em cada. O primeiro foi constituído por 6 réplicas de amostras dos analitos puros, diluídos em solvente (amostras não matrizadas), em 3 níveis diferentes de concentração (nível 01: OMP 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + SMD 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, nível 02: OMP 0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + SMD 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e nível 03: OMP 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + SMD 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O segundo grupo foi constituído por 6 réplicas de amostras dos analitos diluídos em extrato da matriz branco (amostras matrizadas), nos mesmos três níveis de

concentrações do primeiro grupo. Todas as amostras foram analisadas e suas respostas foram quantificadas na curva de calibração. Os resultados foram submetidos a um tratamento estatístico, com o objetivo de verificar se ambos os grupos podem ser considerados iguais e conseqüentemente, demonstrar se há interferência da matriz nos resultados produzidos pelo método.

- c) **Linearidade:** Foi projetada a seguinte curva analítica, para OMP: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e SMD: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O padrão interno SMZ foi mantido na concentração de 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em todos os níveis de concentração da curva de calibração. Foram preparadas três curvas analíticas, fortificando-se amostras branco da matriz que, posteriormente, foram submetidas ao processo de extração. Cada nível de concentração foi injetado duas vezes, totalizando 30 injeções, conforme preconizado no guia adotado³⁷.

A partir dos resultados obtidos, também foi verificada a homocedasticidade e conseqüentemente, a possibilidade da utilização do método dos mínimos quadrados ordinários para a regressão linear.

- d) **Precisão:** Neste trabalho, a avaliação da precisão foi dividida em duas etapas (intradia e interdias). As concentrações testadas na etapa intradia foram de SDM: 2,0; 3,0; e 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para OMP: 0,4; 0,6 e 0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que, cada nível de concentração foi preparado 3 vezes e analisado no mesmo dia. As mesmas concentrações foram testadas para a etapa interdias, sendo que, cada nível de concentração foi preparado uma vez, diariamente e analisado em 3 dias diferentes ($n=3$). O padrão interno SMZ foi mantido na concentração de 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

- e) **Veracidade:** A determinação da veracidade foi realizada através de ensaios de recuperação, utilizando matriz branco fortificada nas concentrações de SDM: 2,0; 3,0; e 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para OMP: 0,4; 0,6 e 0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo o padrão interno SMZ permanente em 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cada nível de concentração foi testado em triplicata ($n=3$), com todas as injeções acontecendo no mesmo dia e no mesmo equipamento, sendo preparadas pelo mesmo analista. ²⁵

- f) **Robustez:** Foram feitas 3 injeções de uma mesma amostra branco fortificada, com concentração de: SDM: $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e OMP: $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, em cada condição de desafio do método. As condições de desafio testadas foram as seguintes: Concentração de ácido fórmico na fase móvel ($\pm 0,01$ % p/v em metanol e em água simultaneamente), alteração da proporção de água/metanol na fase móvel (± 1 % de metanol acidificado na fase móvel), temperatura do forno da coluna ($\pm 1^\circ\text{C}$), fluxo de vazão da fase móvel ($\pm 0,005 \text{ mL min}^{-1}$) e tempo da amostra no banho ultrassônico (± 2 min).

3.8.5.2. Validação do método de quantificação dos analitos no filé de tilápia.

Os ensaios foram executados com base no “*Guidance for Industry Studies to Evaluate the Metabolism and Residue Kinetics of Veterinary Drugs in Food-Producing Animals: Validation of Analytical Methods Used in Residue Depletion Studies*”³⁹, expedido pelo FDA, EUA. Abaixo está descrito como foram realizados os testes:

- a) **Seletividade:** Foi realizada a comparação dos cromatogramas obtidos nas leituras dos preparos da amostra branco (filé de tilápia) e dos obtidos na leitura da amostra branco fortificada com os fármacos SDM e OPM. O objetivo foi detectar a eventual presença de substâncias da matriz que pudessem apresentar resposta analítica (picos cromatográficos), coeluído com os picos cromatográficos dos analitos e consequentemente.
- b) **Efeito da Matriz:** Nesta etapa, foi avaliado se a matriz tem algum efeito sob as respostas obtidas nas leituras dos preparos das amostras. Para tal, realizou-se a comparação das respostas obtidas nas leituras de uma curva analítica obtida com as leituras de preparos dos analitos puros em solução, com as respostas de uma curva analítica obtida com os analitos diluídos no extrato da matriz. As concentrações de ambas as curvas foram equivalentes, cinco pontos equidistantes com concentrações de: 20; 80; 140; 200 e 260 ng g^{-1} . Os resultados da avaliação do efeito da matriz foram obtidos a partir da quantificação do extrato fortificado nos níveis citados, onde foi utilizada a equação da reta da curva

analítica do analito em solução, e expressos em porcentagem do valor esperado subtraído de 100%.

- c) **Linearidade:** Para avaliação da linearidade em filé de tilápia, a curva analítica utilizada para a quantificação de SMD e OMP foi elaborada fortificando amostras branco de filé de tilápia em cinco níveis de concentração: 20, 80, 140, 200, 260 ng g^{-1} . O Padrão interno SMZ foi mantido em 200 ng g^{-1} . Para a fortificação da matriz, foram usados 1,0 g de amostra branco de filé de tilápia. A linearidade foi expressa pelo coeficiente de correlação (r) da curva analítica.
- d) **Limite de Detecção (LD):** Os LD para a determinação de SDM e OMP no filé de tilápia foram estimados através da equação $\text{LD} = \text{DP} \times 3/S$, onde DP é o desvio padrão da resposta de oito replicatas do extrato branco e S é o coeficiente angular (inclinação) da curva analítica.
- e) **Limite de Quantificação (LQ):** é a menor concentração do analito que pode ser determinada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis. O LQ considerado foi o menor nível de concentração utilizado nas curvas de calibração 20 $\mu\text{g g}^{-1}$.
- f) **Precisão:** A avaliação da precisão do método foi dividida em duas etapas (intradia e interdias). A precisão intradia foi avaliada a partir de triplicatas ($n=3$) de análise de amostras branco fortificadas com SDM e OMP em três níveis de concentração (20; 140 e 260 $\mu\text{g g}^{-1}$), sendo o padrão interno (SMZ) mantido à concentração de 200 $\mu\text{g g}^{-1}$. As análises foram realizadas em um mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e expressas como coeficiente de variação (CV, %) para cada nível de concentração avaliado. A precisão interdias foi avaliada para os mesmos três níveis de concentração descritos, no entanto, as repetições foram realizadas em três dias diferentes ($n=3$).
- e) **Exatidão:** A exatidão do método foi avaliada mediante testes de recuperação a partir de amostras brancos fortificadas. Para tanto, uma solução contendo SMD + OMP foi utilizada para a fortificação de amostras branco, nos mesmos três níveis de concentração empregados na avaliação da precisão, com três

repetições, no mesmo dia (n=3). Os resultados foram calculados como porcentagens obtidas das concentrações dos analitos. A Tabela 2 demonstra os critérios de aprovação parametrizados no guia *VICH-FDA (2015)*.

Tabela 2 - critérios de aprovação, segundo o guia VICH-FDA (2015).

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

3.9. Estudo de depleção residual e estimativa de período de carência

O estudo de depleção residual em filés de tilápia teve como objetivo avaliar os resíduos de OMP e SDM no filé de tilápia após a administração oral pela ração, e determinar, ao final, o período de carência. Utilizou-se como referência a própria bula do medicamento *Romet-30*[®], em que indica uma dose de 50 mg de OMP e SMD (kg peso corpóreo) diários, por 5 dias consecutivos. A administração ocorreu a partir de uma ração para peixes comercial disponível no mercado, que foi adicionada com SDM e OMP, pelo método adaptado e testado neste projeto (seção 3.6).

Foram utilizadas 100 tilápias, com o peso médio individual de 289 g, comprados da Piscicultura Jatobá (Igarapava, SP) e posteriormente aclimatados às instalações do Centro de Aquicultura da UNESP (Jaboticabal, SP). Os animais foram alocados em 3 caixas com capacidade de 310 L, abastecidas por um sistema fechado de recirculação de água e aeração forçada. Após o tratamento com a ração, grupos de 10 peixes foram abatidos em 10 tempos diferentes. Os períodos avaliados foram: 4, 8, 24, 32, 48, 56, 72, 80, 96 e 168 horas. Os peixes sofreram eutanásia com administração de benzocaína por banho de imersão (concentração de 0,1 g L⁻¹), método recomendado pelo Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais⁴¹. Após abate, os filés (com pele) foram retirados, embalados em sacos plásticos e estocados em

freezer a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises no sistema CLAE-EM/EM. A partir da análise dos resultados dessas amostras, foram obtidas as curvas de depleção. Todo o experimento e o tratamento dos dados para estimativa do período de carência, foram conduzidos conforme outros estudos já realizados pelo responsável deste projeto. Nos quadros 2 e 3, seguem registros fotográficos do experimento

Quadro 2 – Alimentação dos peixes com ração medicada durante o experimento de depleção: A) Tratamento dos peixes; B) Tanque após tratamento com visível flutuabilidade da ração.



Quadro 3 – Obtenção das amostras: A) Abate dos peixes em solução de benzocaína; B) Animal abatido; C) Extração dos filés; D) Filé processado.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Método analítico para análise na ração

Inicialmente, tomou-se como referência inicial para o desenvolvimento do método analítico voltado à determinação dos fármacos na ração, aquele previamente desenvolvido por este grupo de pesquisa (Fais et al, 2017)⁴⁵.

O único ajuste realizado no método de extração foi a redução do volume de líquido extrator de 10 mL para 5 mL. Considerando que foram realizados em torno de 500 preparos de amostras para a validação do método analítico e para a avaliação do processo de incorporação de SDM e OMP na ração, foram poupados em torno de 2500 mL de metanol, somente com este ajuste, tornando a sua execução mais econômica e com menor impacto ambiental.

As condições cromatográficas foram alteradas e testadas por procedimento experimental uni variado até a seleção da condição que apresentasse picos simétricos e de resposta satisfatória, sem que a corrida cromatográfica se tornasse demasiadamente longa. A Tabela 3 compara os principais parâmetros ajustados e através dela nota-se que o método analítico teve uma significativa redução de 8 minutos por corrida cromatográfica e, considerando que os 500 preparos citados no parágrafo anterior foram injetados no sistema CLAE MS/MS, um total de 4000 minutos de uso do equipamento foram poupados, e cerca de 700 mL de fase móvel também deixaram de ser utilizados.

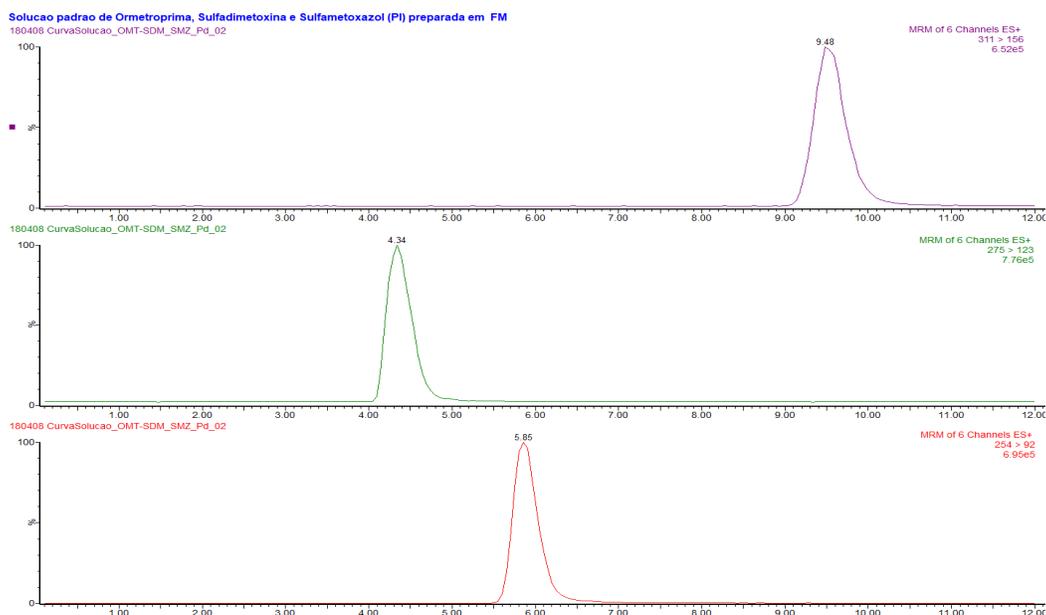
A preocupação com os custos de execução é importante, pois além de viabilizar este estudo e prover o uso racional das verbas disponíveis, poderá atrair empresas interessadas em registrar o uso dessas substâncias no país, norteando seus projetos. O método analítico foi validado tendo como base o guia de validação analítico expedido pela autoridade fiscalizadora da aquicultura no país²⁵, harmonizando-o com as exigências normativas vigentes.

A Figura 8 apresenta um cromatograma obtido com a utilização do método cromatográfico, é possível notar que os picos estão simétricos e bem resolvidos.

Tabela 3 – Comparação dos métodos analíticos

Parâmetro	Método Base	Método ajustado
Tempo de corrida	20 min.	12 min.
Modo de eluição	Gradiente	Isocrático
Fase Móvel	(A) 0,1% de ácido fórmico em água e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila.	(A) 0,5% de ácido fórmico em água ultrapura e (B) 0,5% de ácido fórmico em metanol
Vasão da Fase Móvel	0,25 mL min ⁻¹	0,30 mL min ⁻¹
Temperaturas da fonte de ionização	100°C	100°C
Temperatura do gás de dessolvatação	350°C	350°C
Vazão do gás de nebulização	40 L h ⁻¹	75 L h ⁻¹
Vazão do gás de dessolvatação	380 L h ⁻¹	471 L h ⁻¹

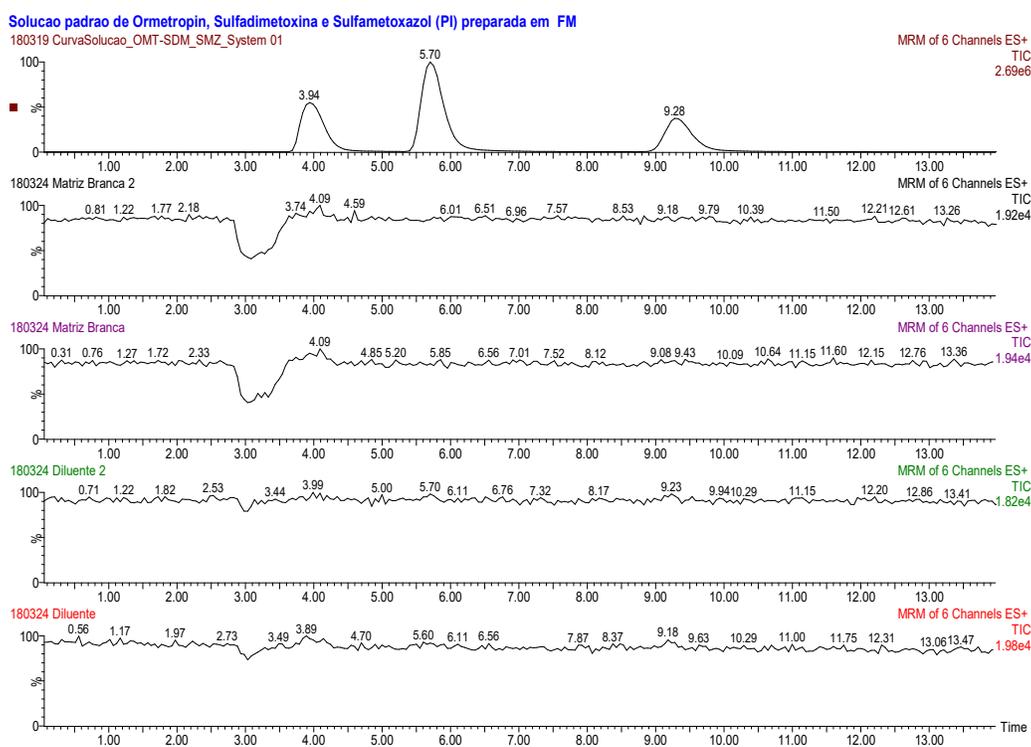
Figura 8 – Cromatogramas obtidos após leitura dos padrões SDM + OMP + SMZ utilizando o método ajustado para o sistema CLAE-EM/EM



4.1.1 Validação do método analítico para análise na ração

- a) **Seletividade:** A seletividade do método foi demonstrada através da comparação dos cromatogramas da matriz branco após sofrer o processo de extração, do diluente puro e dos analitos diluídos em solução. Por inspeção visual foi possível verificar que no mesmo tempo de retenção dos analitos, não houve resposta nos cromatogramas da matriz branco e do diluente utilizado no preparo do analito puro em solução, evidenciando que o método é seletivo para análise dos compostos nesta matriz.

Figura 09 - Cromatogramas Teste de Seletividade - Método Ração



A tabela 4 demonstra os resultados obtidos nos testes T de Student aplicados em todos os dados obtidos através do teste do efeito da matriz. Através deles foi possível verificar que não houve efeito da matriz sobre as respostas dos analitos, pois a população dos resultados obtidos através das leituras das amostras dos analitos diluídos em solvente foram estatisticamente iguais à população das leituras das amostras matrizadas, em todas as concentrações testadas. Sendo assim, a matriz não impactou na resposta obtida dos analitos. O fato da matriz não interferir na resposta lida dos analitos também possibilitou que durante os experimentos realizados para controlar a qualidade da ração medicada fossem

utilizadas curvas de calibração diluídas em solvente, reduzindo o tempo total de execução do experimento e os custos com processos extrativos.

Tabela 4 – resultados obtidos no teste estatístico T de Student aplicados nos resultados obtidos no ensaio de verificação do efeito da matriz sob os analitos

Analito	Nível de Fortificação	T crítico	T calculado
SDM	01	1,94	-0,68
	02	1,83	0,26
	03	1,81	-0,48
OMP	01	1,81	0,48
	02	1,81	-0,45
	03	1,81	-2,14

- b) **Linearidade:** A avaliação do parâmetro de linearidade foi feita através do cálculo do coeficiente de correlação linear (r). O critério mínimo aceitável recomendado é de $r \geq 0,99$ e este parâmetro foi alcançado em todas as curvas analíticas, fato que ilustra que as respostas obtidas são proporcionais às cinco concentrações testadas. A tabela 5, demonstra as curvas de calibração obtidas e o (r) encontrado em cada curva de calibração:

Tabela 5 – Curvas de calibração obtidas durante o experimento de linearidade

Analito	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
SDM – Curva 1	$y = 0.649702043x + 0.045813$	0,9992
SDM – Curva 2	$y = 0.648385907x + 0.055307$	0,9981
SDM – Curva 3	$y = 0.6280332x + 0.16070941$	0,9994
SDM – Curva 4	$y = 0.635297335x + 0.157228$	0,9998
SDM – Curva 5	$y = 0.663925212x + 0.011130$	1,0000
SDM – Curva 6	$y = 0.6650808x + 0.02813707$	0,9996
OMP – Curva 1	$y = 1.234344261 + 0.23204523$	0,9974
OMP – Curva 2	$y = 1.247842845 + 0.219418$	0,9968
OMP – Curva 3	$y = 1.19771152 + 0.30436194$	0,9958
OMP – Curva 4	$y = 1,208849516 + 0.29351630$	0,9952
OMP – Curva 5	$y = 1,338253288 + 0.2728897$	0,9666
OMP – Curva 6	$y = 1.34252708 + 0.27007743$	0,9964

Foi realizado também o teste estatístico F (Fisher-Snedecor) para verificar o comportamento homocedástico dos dados. Nas tabelas 6 e 7, estão demonstrados os resultados obtidos no teste estatístico e é possível notar que o F calculado é menor que o F crítico, sendo assim, conforme descrito no guia de validação adotado, o método foi considerado homocedástico, ou seja, a dispersão dos resultados não apresentou formato cônico ou tendência que demonstrasse comportamento heterocedástico dos dados. Os gráficos dos resíduos de ambos os analitos também foram gerados e analisados e conforme demonstrado nas figuras 10 e 11, é possível verificar que não houve comportamento tendencioso nos dois analitos analisados.

Figura 10 - Gráfico de resíduos SDM - Método Razão

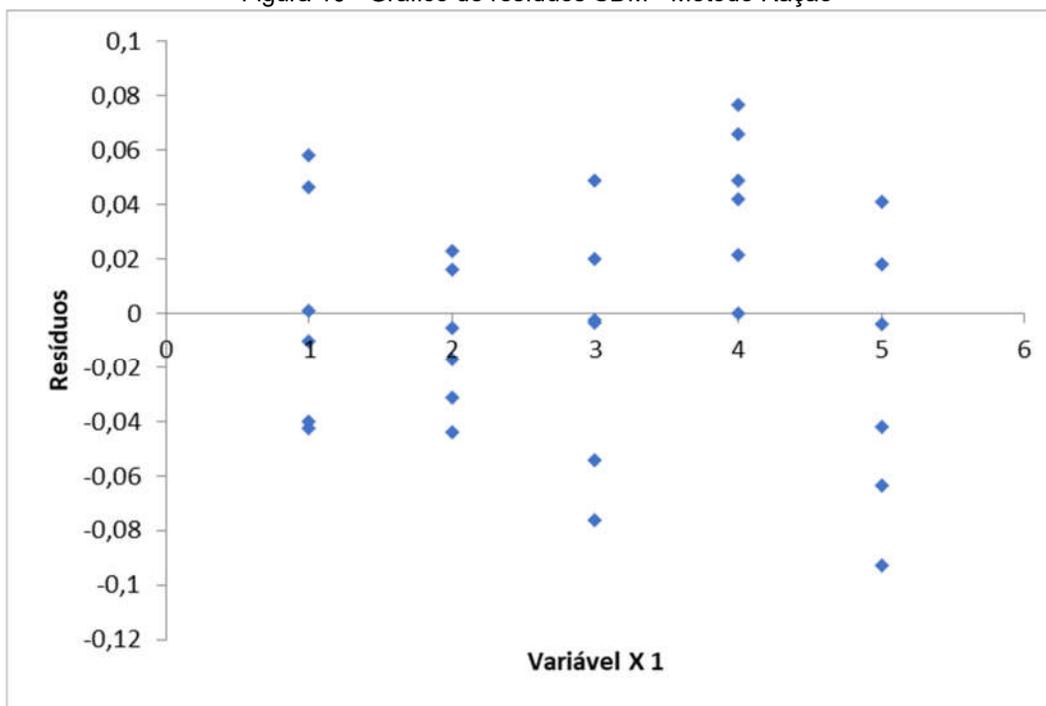


Figura 11 - Gráfico de resíduos OMP - Método Ração

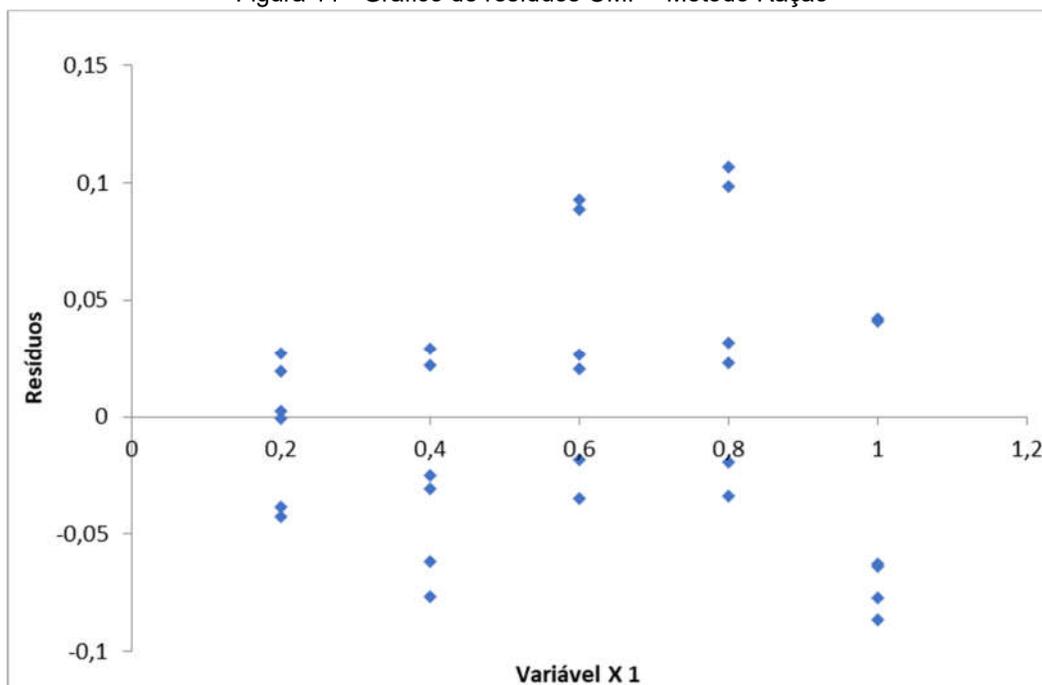


Tabela 6 - Teste F para variâncias SDM - Método Ração

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	-0,02391	-0,00975
Variância	0,002606	0,000692
Observaçã	6	6
gl	5	5
F	3,766364	
P(F<=f) un	0,085944	
F crítico ur	5,050329	

Tabela 7 - Teste F para variâncias OMP - Método Ração

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	-0,03459	-0,00542
Variância	0,003558	0,000849
Observaçã	6	6
gl	5	5
F	4,190421	
P(F<=f) un	0,070943	
F crítico ur	5,050329	

- c) **Precisão e veracidade:** Os resultados dos testes de precisão e veracidade, exibidos na Tabela 8, demonstraram-se dentro dos parâmetros compendiais de referência. Conforme demonstrado abaixo:

Tabela 8 - Resultados obtidos para os ensaios de Veracidade / Recuperação para injeções no mesmo dia.

Analito	Nível de fortificação	% Veracidade/ Recuperação	CV (%)
SDM	1	99,1	1,2
	2	101,1	0,9
	3	100,2	1,3
OMP	1	100,2	0,7
	2	102,5	2,2
	3	101,9	1,0

A Tabela 9 demonstra os resultados dos testes de veracidade e precisão, com injeções feitas em dias diferentes (N=3), para SDM e OMP:

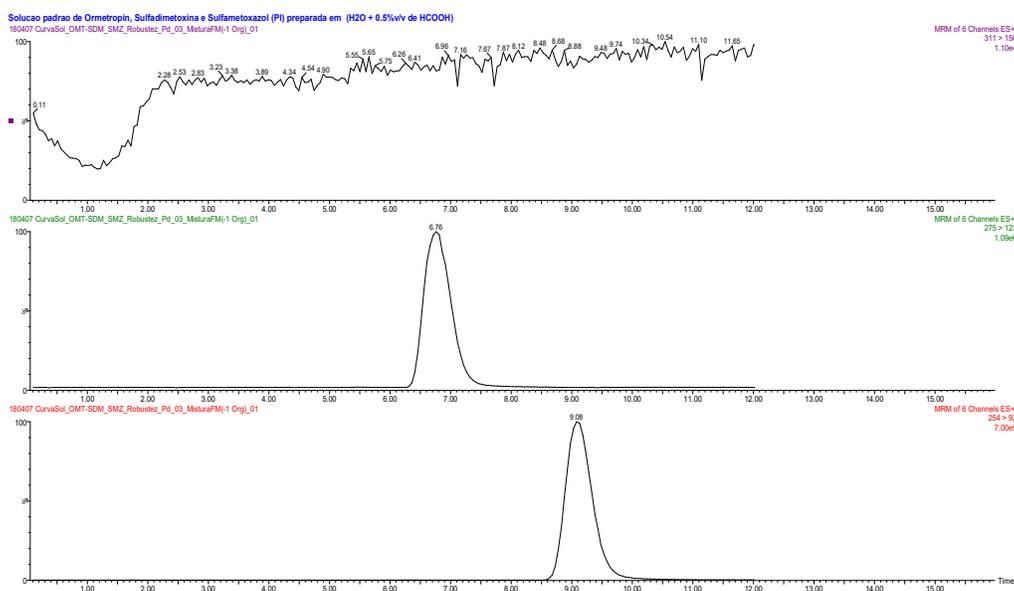
Tabela 9 - Resultados obtidos para os ensaios de Veracidade / Recuperação para injeções em dias diferentes.

Analito	Nível de fortificação	% Veracidade/ Recuperação	CV (%)
SDM	1	100,2	1,8
	2	102,1	1,8
	3	100,7	0,8
OMP	1	98,7	2,2
	2	102,9	2,4
	3	101,7	2,3

- d) **Eficiência de Extração:** O método de extração foi avaliado pela sua eficiência em extrair os analitos OMP e SDM da ração medicada. Durante os testes para avaliar a seletividade do método, foi demonstrado que a matriz não tem efeito sob os resultados obtidos, sendo assim, os resultados para eficiência de extração foram de: 100% para SDM e 85% para OMP. Considerados altamente eficiente para SDM e moderadamente eficiente para OMP.

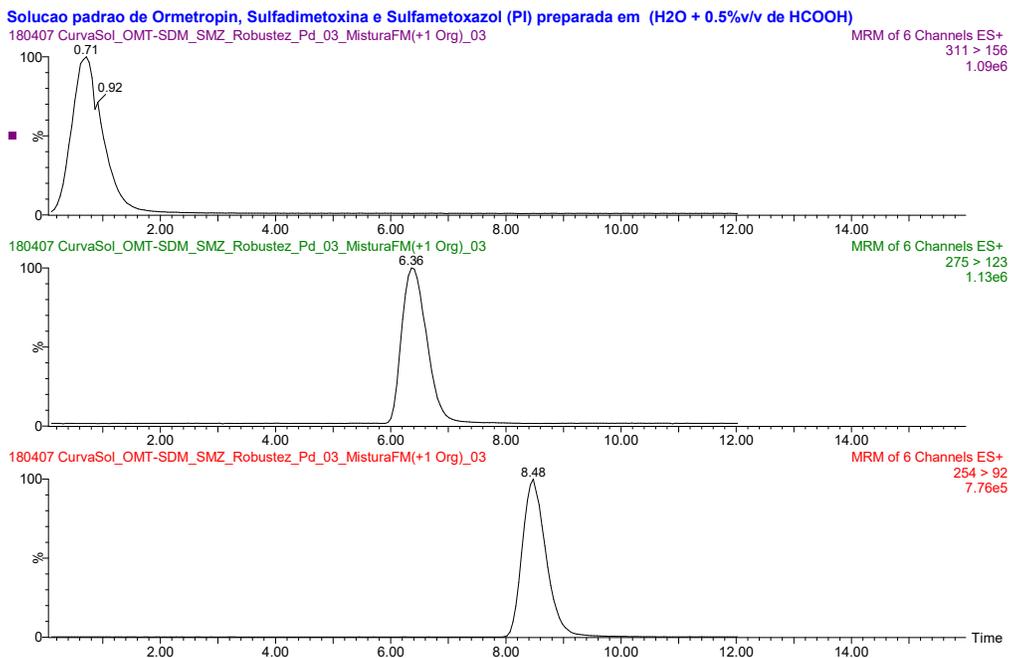
e) **Robutez:** Para os testes de robustez do método, apenas os desafios envolvendo a variação na composição da fase móvel demonstrou efeito significativo. Para o teste utilizando -1% MeOH, o tempo de retenção do analito OMP variou de 4,24 minutos para 6,24 min., para SMZ o tempo de retenção variou de 5,60 min. para 8,43 min. e para SMD o tempo de corrida do método não foi suficiente para eluí-lo. A Figura 12 apresenta o cromatograma referente a este teste, evidenciando forte influencia desta condição analítica no método.

Figura 12 – Cromatograma obtido durante o teste de robustez com a fase móvel sendo confeccionada com -1% de MeOH



Para o teste utilizando +1% MeOH, o tempo de retenção do analito OMP obtido foi de 0,71 min., para SMZ o tempo de retenção foi de 6,43 min. e para SMD o tempo de retenção observado foi de 8,48 min. A Figura 14 apresenta o cromatograma referente a este teste, evidenciando forte influência desta condição analítica no método também. Conclui-se que o método foi robusto a pequenas variações no fluxo da vazão da fase móvel, na temperatura do forno e na concentração de ácido fórmico contida na fase móvel, porém as proporções de água e metanol contidas na fase móvel devem ser rigorosamente controladas.

Figura 13 Cromatograma obtido durante o teste de robustez com a fase móvel sendo confeccionada com +1% de MeOH



4.2. Ensaio de lixiviação

Segundo CANTELMO et al.⁴⁶, a ração disponibilizada para os peixes deve permanecer na água por até 10 minutos, até que seja consumida pelos animais. Sendo assim, há o risco de os fármacos migrarem do revestimento para a água (lixiviação). Este projeto investigou duas substâncias de polaridades e solubilidades distintas que precisam ser ministradas na proporção de 5:1, para que ocorra o efeito antimicrobiano sinérgico. Sendo assim é importante verificar se os fármacos migraram para água e quais proporções isso ocorreu. Não era desejado que apenas uma das substâncias permanecesse na ração. Conforme mencionado, o teste foi executado e foram retiradas amostras nos tempos 5, 10 e 15 minutos que foram posteriormente analisadas. Os resultados obtidos nas leituras destas amostras não apresentaram resposta suficiente para serem quantificados na curva de calibração, nem mesmo por extrapolação, evidenciando que os fármacos não lixiviaram para a água dentro do período testado.

A diferença de polaridade entre as moléculas dos fármacos poderia ser um fator agravante, pois em contato com a água, o composto mais polar (OMP),

tende a lixiviar em maior quantidade da ração para o fármaco. Uma lixiviação de forma desproporcional, favorecendo mais um fármaco que o outro, poderia impactar de forma negativa na proporção inicial pretendida. Outro fator relevante seria a capacidade da água em solubilizar as substâncias, porém, conforme demonstrado, a concentração máxima possível das duas substâncias (caso migrassem totalmente para a água) é menor que a capacidade da água em solubilizá-las.

Esse mesmo grupo de pesquisa já havia testado outra forma de incorporação destas duas substâncias ativas em ração comercial. O método consiste em misturar um medicamento utilizado para linha animal de pequeno porte, chamado Trissulfin SID (Ourofino Saúde Animal, Cravinhos-SP), contendo as duas substâncias ativas, em óleo de peixe. Essa mistura é adicionada na ração, que posteriormente é seca em estufa. Apesar de muito prática e de fácil execução, este método, apresentou lixiviação de 1,5% de SDM em água e 15,0% de OMP para a água, após 15 minutos. Esta alta taxa de lixiviação poderia acarretar na contaminação dos tanques e uma dose menor da substância oferecida ao peixe, além de alterar a proporção entre os medicamentos. O fornecedor do medicamento ROMET30 também não recomenda misturar essas substâncias ativas em óleo de peixe, por conta do mau gosto gerado, que poderia afetar a palatabilidade da ração medicada.

Também foi observado neste teste que a ração manteve sua flutuabilidade após o processo de incorporação. Esse fato é muito importante, pois possibilita que o aquicultor monitore a quantidade de ração medicada ingerida pelos peixes e conseqüentemente, o progresso posológico do tratamento.

4.3. Incorporação do fármaco à ração

Durante o delineamento do “estudo de depleção residual e estimativa de período de carência” determinou-se que seriam consumidos 1250g de ração medicada. Para atender essa demanda, formulou-se 9 lotes de 250g, sendo que, os 5 lotes que apresentaram o teor de cada substância ativa mais próximo do pretendido e com uma variação menor entre as 3 medições, seriam os selecionados para o estudo. Também foi verificado se a proporção de 5 partes de SDM para 1 parte de OMP foi mantida. A concentração esperada é de: e 4,3

mg g⁻¹ para SDM e 0,7 mg g⁻¹ para OMP. As tabelas 10 e 11 demonstram os resultados de todas as medições realizadas:

Tabela 10 - Resultados obtidos no ensaio de verificação da qualidade da ração incorporada, para a substância Ormetoprima.

	Teor de OMP (mg g⁻¹)	CV (% , n=3)
Lote 01	0.6	10.9
Lote 02	0.7	7.8
Lote 03	0.7	0.7
Lote 04	0.8	8.7
Lote 05	0.7	6.7
Lote 06	0.7	3.6
Lote 07	0.8	9.1
Lote 08	0.7	6.0
Lote 09	0.8	5.2

Tabela 11- Resultados obtidos no ensaio de verificação da qualidade da ração incorporada para a substância Sulfadimetoxina.

	Teor de SDM (mg g⁻¹)	CV (% , n=3)
Lote 01	3.3	8.8
Lote 02	3.9	7.1
Lote 03	4.2	5.5
Lote 04	4.1	6.0
Lote 05	4.0	4.5
Lote 06	4.3	5.5
Lote 07	4.3	5.5
Lote 08	4.1	10.9
Lote 09	4.4	2.8

Os lotes 02, 04, 06, 07 e 08 foram eleitos para serem utilizados nos estudos.

O método de incorporação da ração foi testado por método analítico validado e se demonstrou satisfatório, devido à relativa homogeneidade dos princípios ativos por todo o lote produzido e pela proximidade dos teores encontrados experimentalmente com os teores esperados. As proporções sinérgicas de 5:1 (SDM:OMP) também foram mantidas. A característica de fluabilidade foi mantida e ao entrar em contato com a água os princípios ativos não migraram para água dentro do período testado (15 minutos), que é o suficiente para o peixe se alimentar. O fato das duas moléculas terem

polaridades distintas e o OMP ter uma tendência de migrar para a água com maior facilidade também foi superado pelo revestimento proposto neste projeto de pesquisa e sendo assim, o risco de contaminação do meio ambiente foi reduzido.

A ração revestida por este método pode ser utilizada nos estudos de depleção e sugere que outras substâncias também sejam testadas por este mesmo método de revestimento.

A Figura 14 ilustra os lotes produzidos para serem utilizados durante o experimento de depleção.

Figura 14 - Lotes produzidos com o processo de incorporação proposto neste estudo.



4.4. Método analítico para análise no filé

O procedimento de extração utilizado inicialmente para determinação de SDM e OMP em filé, foi adaptado do método descrito por Phu et al. (2014)⁴⁴, no qual utiliza um método do tipo QuEChERS modificado.

O método original foi ajustado de forma a reduzir os custos de execução e a geração de resíduos, utilizando os recursos financeiros disponíveis da maneira mais racional possível e diminuindo os impactos gerados ao meio ambiente. O tempo de execução total do procedimento também foi reduzido significativamente.

Inicialmente, foram testadas diversas soluções extratoras, sendo aquela composta apenas por ACN e H₂O (em proporções de 5:1) a escolhida. Esta solução solubilizou as substâncias OMP e SDM puras com maior facilidade e em contato com a matriz, apresentou um extrato límpido. Outro fato relevante relacionado à solução extratora é que devido ao extrato límpido produzido, ao

serem realizadas várias leituras no sistema CLAE-EM/EM, o defletor do equipamento apresentava pouca sujidade proveniente do extrato, evitando que os longos experimentos realizados neste projeto necessitassem ser interrompidos para executar a limpeza do equipamento analítico.

Em relação ao método original, a alíquota que foi submetida à etapa de limpeza teve seu volume reduzido de 10 mL para 3 mL, a fim de aumentar a concentração de PSA e sulfato de magnésio nesta, potencializando a função de limpeza dos reagentes. O processo de centrifugação passou a ser realizado em baixa temperatura (4°C), para promover a solidificação das gorduras presentes no extrato, possibilitando que ela migre para o fundo do tubo falcon.

O processo de secagem foi excluído, pois o novo método desenvolvido para o sistema CLAE-EM/EM obteve resposta instrumental suficiente para que este procedimento não fosse necessário, diminuindo drasticamente o tempo de execução da análise. Considerando que o processo de secagem leva em torno de 2 horas para ser concluído, e que durante o experimento de depleção foram preparadas 100 amostras, somente neste experimento foram poupadas 200 horas de processo.

O reagente octadecilsilano (C18) foi excluído, pois este diminuiu a eficiência da extração, provavelmente, por além de adsorver substâncias interferentes presentes no extrato, também adsorveu os analitos, uma vez que o C18 é o mesmo composto utilizado no recheio da coluna cromatográfica (que ambos os analitos demonstraram retenção).

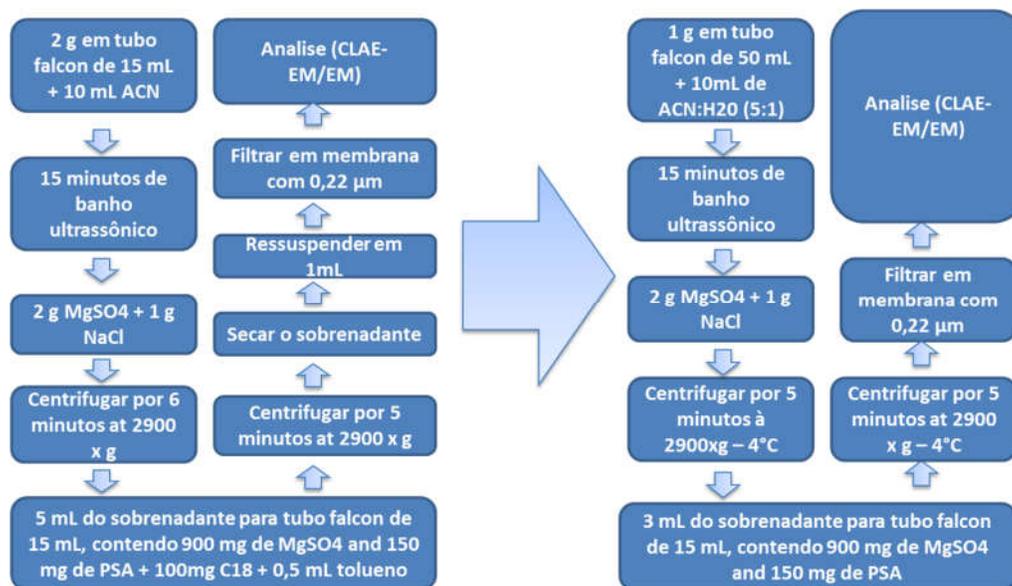
O composto tolueno também foi excluído, pois além de altamente tóxico (aumentando o risco de execução do procedimento), não era mais necessário, uma vez que era utilizado para facilitar o processo evaporação dos solventes do extrato durante a secagem.

Com a exclusão da adição de C18 e tolueno os custos de execução também foram reduzidos.

O uso do Sulfato de magnésio foi mantido, para promover a desidratação do extrato, assim como o Cloreto de Sódio para promover o efeito "Salting Out". Uma vez que o extrato inicial é oriundo de uma matriz rica em proteínas, o PSA também foi mantido para promover, principalmente, a precipitação das proteínas presentes.

A figura 15, demonstra dois fluxogramas e compara o método extrativo inicial com o modificado por este estudo:

Figura 15 - Comparativo entre o método de extração inicial e o método ajustado.



4.4.1 Validação analítica

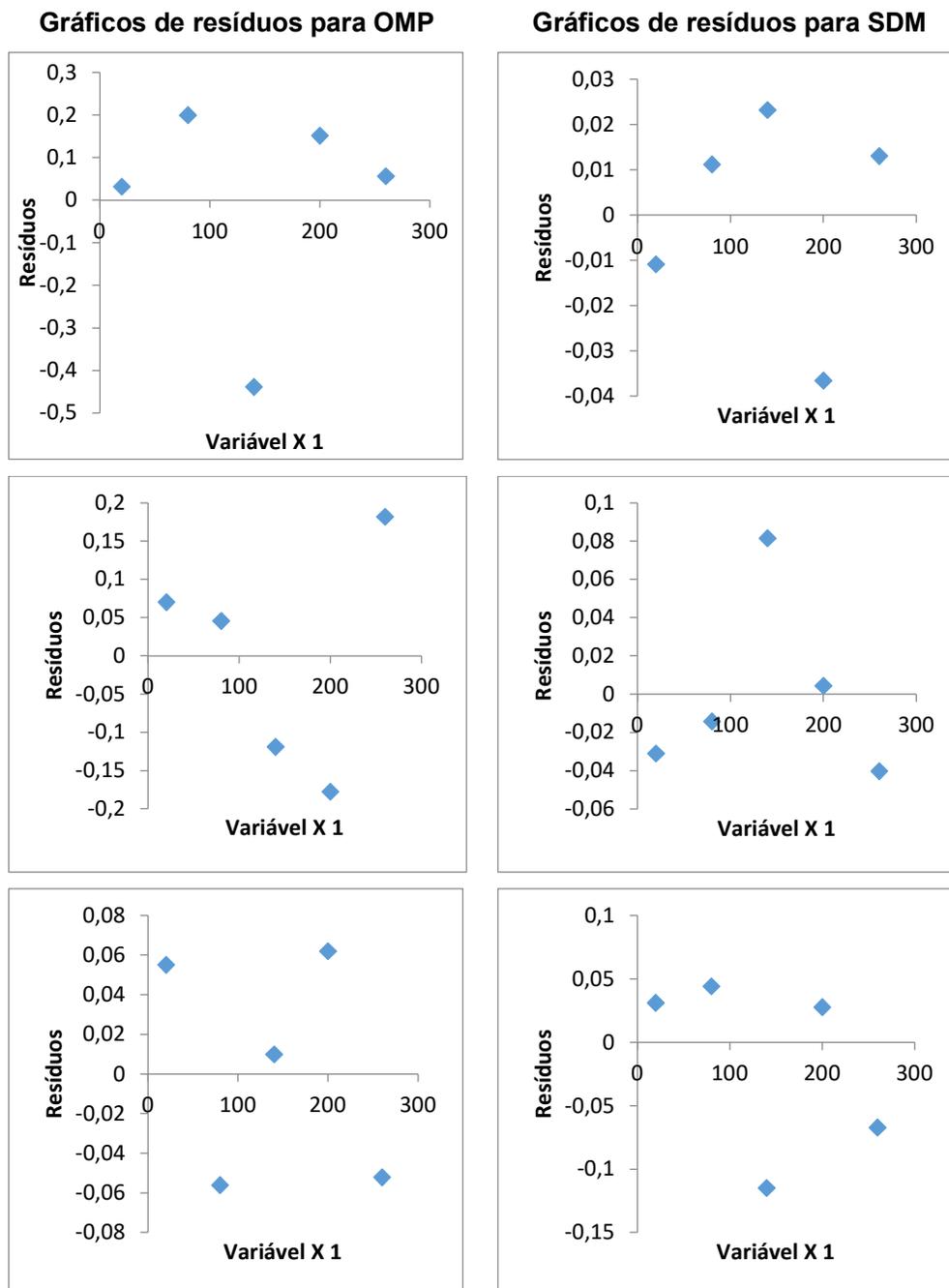
- **Linearidade:** Para avaliação da linearidade, a curva analítica utilizada para a quantificação de SDM e OMP foi elaborada fortificando amostras branco de filé de tilápia em cinco níveis de concentração: 20, 80, 140, 200, 240 ng g⁻¹ para ambos os analitos. A tabela 12 trás as curvas de calibração e os coeficientes de correlação obtidos.

Tabela 12 – Curvas de calibração obtidas durante o experimento de linearidade para a validação do método de determinação de SDM e OMP no filé da tilápia.

Analito	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
SDM – Curva 1	$y = 0.008553x + 0.004643$	1.000
SDM – Curva 2	$y = 0.008371x + 0.050278$	0.998
SDM – Curva 3	$y = 0.008238x - 0.04512$	0.996
OMP – Curva 1	$y = 0.035225x - 0.04227$	0.997
OMP – Curva 2	$y = 0.036466x - 0.12228$	0.999
OMP – Curva 3	$y = 0.037201x - 0.04512$	0.999

A tabela 13 traz os gráficos dos resíduos mensurados em todas as curvas de calibração elaboradas.

Tabela 13 – Gráficos de resíduos obtidos durante o experimento de linearidade.



As curvas analíticas apresentaram um coeficiente de correlação (r) superior a 0,99. Demonstrando que o método é linear, ou seja, que as respostas obtidas nas leituras dos padrões são proporcionais as concentrações de cada analito.

- **Seletividade:** Os cromatogramas obtidos para a amostra branco de filé de tilápia não demonstrou resposta analítica no tempo de retenção que eram esperados os picos cromatográficos dos analitos. Este cromatograma (amostra branco), também foi comparado com um cromatograma obtido na leitura de uma amostra branco fortificada com OMP e SDM na concentração de 120 ng g^{-1} . Sendo assim, o método foi considerado seletivo, uma vez que a amostra do extrato branco não apresentou resposta analítica.
- **Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ):** O resultado estimado para LD foi de 1 ng g^{-1} para OMP e 3 ng g^{-1} para SDM. O LQ foi de 20 ng g^{-1} para ambos os analitos, com precisão (%CV) de 2,3 para OMP e 8,4% para SMD. Já a exatidão (expressa na forma de recuperação) fora de 107,2% OMP e 85,4% para SDM.
- **Precisão e exatidão:** O parâmetro de precisão do método foi avaliado com análises em triplicata, realizadas no mesmo dia (precisão intradia), pelo mesmo analista e por análise de amostras realizadas em três dias diferentes (precisão interdias), pelo mesmo analista nas mesmas condições analíticas e nas mesmas concentrações do teste intradias. As concentrações foram de: 20, 120 e 240 ng g^{-1} . Já o parâmetro de exatidão também foi estimado a partir da análise de amostras em triplicata, realizadas no mesmo dia e pelo mesmo analista, nas mesmas concentrações empregadas na avaliação da precisão. Todos os resultados estão dentro do preconizado no compêndio de referência, o *“Guidance for Industry Studies to Evaluate the Metabolism and Residue Kinetics of Veterinary Drugs in Food-Producing Animals: Validation of Analytical Methods Used in Residue Depletion Studies”*³⁹, sendo assim, foram considerados aceitos. Os resultados obtidos na avaliação da precisão e da exatidão do método estão demonstrados na tabela 16 e 17. É possível que dentro dos critérios estabelecidos o método demonstre resultados próximo do esperado e com relativa precisão para ambos os analitos.

O método para determinação de OMP e SDM presentes no filé se demonstrou adequado aos fins que foi proposto. O método analítico pode ser utilizado para determinação de OMP e SDM no estudo de depleção, objeto

primário de deste estudo. Este método também pode servir como base para fiscalização de carne de tilápia importada ou mesmo para verificar o uso abusivo e ilegal de OMP e SDM no cenário nacional.

Tabela 14 – Resultados obtidos durante os ensaios de exatidão e precisão para analito OMP

Concentração de OMP	Precisão Intradia, n=3 (CV, %)	Precisão Interdias, n=3 (CV, %)	Exatidão n=3 (Rec, %)
20 ng g ⁻¹	2,3	2,5	107
120 ng g ⁻¹	3,6	0,9	95
240 ng g ⁻¹	0,8	0,9	101

Tabela 15 - Resultados obtidos durante os ensaios de exatidão e precisão para analito OMP

Concentração de SDM	Precisão Intradia, n=3 (CV, %)	Precisão Interdias, n=3 (CV, %)	Exatidão n=3 (Rec, %)
20 ng g ⁻¹	8,4	5,1	85
120 ng g ⁻¹	3,8	3,3	106
240 ng g ⁻¹	1,9	4,7	99

4.5. Avaliação dos resultados de depleção residual de sulfadimetoxina e ormetoprima em filés de tilápia

Os resultados analíticos obtidos a partir das análises das amostras de filés de tilápia quanto às concentrações de SDM e OMP são apresentados na Tabela 18, eles foram ordenados de forma decrescente para facilitar a leitura dos dados. Conforme pode ser observado nos dados da Tabela 18, referente às análises de amostras obtidas do abate dos peixes 168 horas após o tratamento com a medicação, a maioria das amostras apresentaram concentrações inferiores ao LQ (20 ng g⁻¹) do método e, por essa razão, não serão consideradas nos cálculos para a estimativa do período de carência.

Na Tabela 18 também é possível verificar uma grande variação entre os resultados do mesmo tempo de abate. O fato de separar os 100 animais em apenas três tanques pode ter promovido uma maior competição entre os animais pelo alimento oferecido, e considerando que a medicação foi ministrada através

de ração, há também diferença na ingestão do fármaco entre eles. Outro fato relevante e que pode ter contribuído para a grande variação encontrada é a variação entre os pesos dos animais. Entre 100 animais utilizados no experimento o peso deles variou entre: 163 – 621g, com desvio padrão de 85 e média de 290g.

Tabela 16 - Resultados analíticos das amostras de filé (carne + pele) de tilápia.

Abate	Peixe	OMP (ng g ⁻¹)	SDM (ng g ⁻¹)	SOMA (ng g ⁻¹)	Abate	Peixe	OMP (ng g ⁻¹)	SDM (ng g ⁻¹)	SOMA (ng g ⁻¹)
2 horas após o tratamento	1	3546	2307	5853	18 horas após o tratamento	1	2765	2756	5520
	2	3408	2278	5686		2	2536	2736	5272
	3	2767	2249	5016		3	1937	2193	4129
	4	2673	2121	4794		4	1773	1789	3562
	5	2374	1938	4312		5	1267	1696	2964
	6	2192	1816	4009		6	1256	1677	2933
	7	2150	1647	3797		7	1164	1626	2790
	8	1830	1424	3254		8	1067	1111	2178
	9	1786	1197	2982		9	879	1069	1948
	10	1357	1152	2510		10	808	485	1293
	<i>Média</i>	<i>2408</i>	<i>1813</i>	<i>4221</i>		<i>Média</i>	<i>1545</i>	<i>1714</i>	<i>3259</i>
	<i>Desvio</i>	<i>702</i>	<i>442</i>	<i>1125</i>		<i>Desvio</i>	<i>683</i>	<i>720</i>	<i>1382</i>
26 horas após o tratamento	1	1607	940	2547	42 horas após o tratamento	1	336	238	574
	2	1502	938	2440		2	313	233	546
	3	1265	881	2146		3	304	200	504
	4	1093	763	1856		4	280	182	462
	5	1025	722	1747		5	220	154	374
	6	913	659	1571		6	168	84	252
	7	926	483	1409		7	127	77	204
	8	898	336	1233		8	126	49	175
	9	821	250	1072		9	120	42	162
	10	373	189	562		10	23	37	60
	<i>Média</i>	<i>1042</i>	<i>616</i>	<i>1658</i>		<i>Média</i>	<i>202</i>	<i>130</i>	<i>331</i>
	<i>Desvio</i>	<i>354</i>	<i>284</i>	<i>622</i>		<i>Desvio</i>	<i>105</i>	<i>81</i>	<i>183</i>
50 horas após o	1	564	121	686	66 horas após o	1	491	241	733
	2	416	110	526		2	412	176	588
	3	152	87	239		3	360	104	464

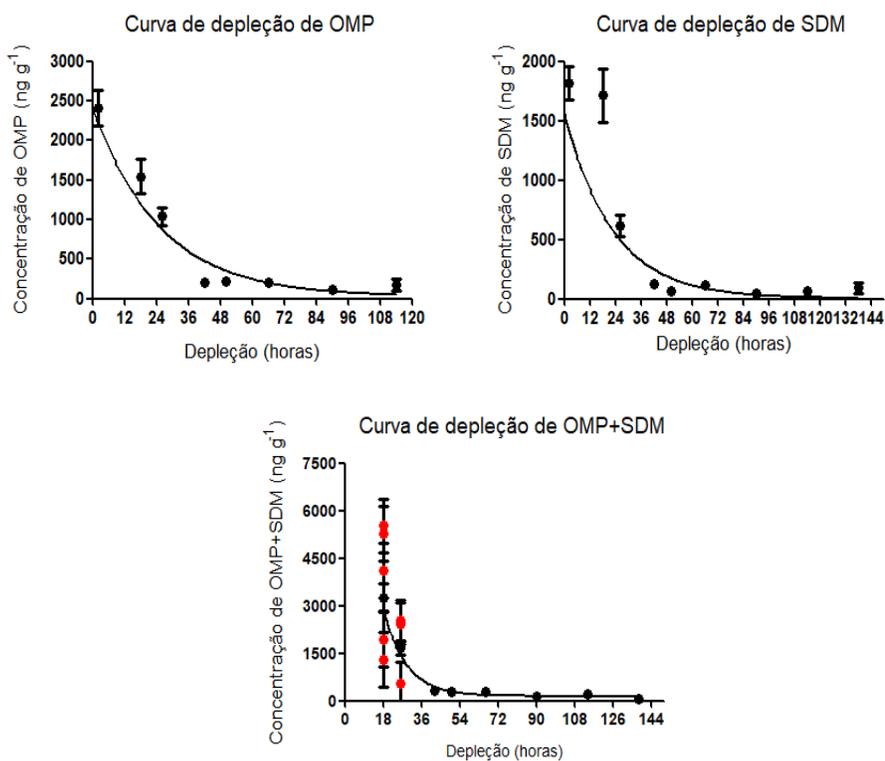
	4	188	77	265		4	319	78	397
	5	182	60	242		5	156	71	227
	6	169	58	226		6	115	35	149
	7	150	56	206		7	77	10	87
	8	127	48	174		8	54	10	64
	9	122	18	140		9	48	10	58
	10	110	16	126		10	35	10	45
	<i>Média</i>	218	65	283		<i>Média</i>	207	75	281
	<i>Desvio</i>	150	35	180		<i>Desvio</i>	172	80	249
90 horas após o tratamento	1	250	78	328	114 horas após o tratamento	1	771	124	894
	2	172	70	242		2	266	85	351
	3	142	63	205		3	125	63	188
	4	116	40	156		4	114	54	168
	5	104	38	142		5	103	36	139
	6	103	35	139		6	102	20	123
	7	101	19	120		7	87	10	97
	8	83	10	93		8	87	10	97
	9	72	10	82		9	75	10	85
	10	69	10	79		10	29	10	39
	<i>Média</i>	121	37	159		<i>Média</i>	176	42	218
	<i>Desvio</i>	55	26	79		<i>Desvio</i>	218	39	252
138 horas após o tratamento	1	59	278	338	168 horas após o tratamento	1	26	39	64
	2	38	74	112		2	24	35	59
	3	34	60	95		3	<LOQ	35	45
	4	23	41	64		4	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	5	<LOQ	21	31		5	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	6	<LOQ	<LOQ	<LOQ		6	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	7	<LOQ	<LOQ	<LOQ		7	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	8	<LOQ	<LOQ	<LOQ		8	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	9	<LOQ	<LOQ	<LOQ		9	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	10	<LOQ	<LOQ	<LOQ		10	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	<i>Média</i>	-	-	-		<i>Média</i>	-	-	-
	<i>Desvio</i>	-	-	-		<i>Desvio</i>	-	-	-

O melhor modelo matemático não linear de ajuste que retrata o perfil de depleção residual de OMP e SDM obtido foi o de decaimento de primeira fase, cujos gráficos são apresentados a seguir, na Figura 16.

Para o melhor ajuste do modelo matemático escolhido, a obtenção da curva de depleção a partir da soma dos resíduos de OMP e SDM foi realizada com os dados obtidos a partir do tempo de 18 horas após o término do tratamento com a medicação.

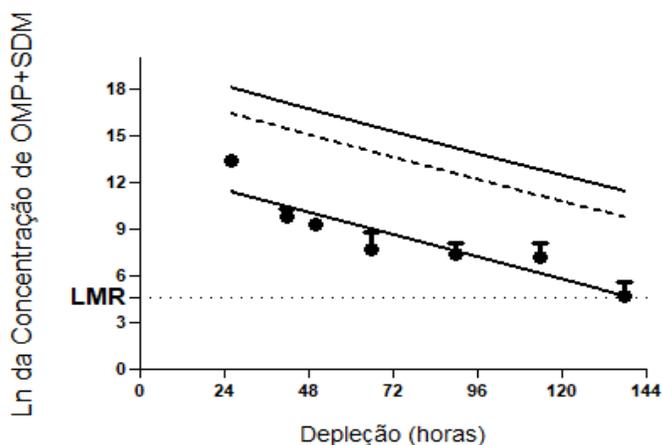
Para que os dados de um estudo de depleção residual possam ser empregados numa análise estatística para estimar um período de carência, é necessário que se disponha de pelo menos três períodos de abate em que as concentrações residuais indiquem um perfil terminal de eliminação, ou seja, que as concentrações dos resíduos marcadores estejam diminuindo conforme aumenta o tempo de abate após o tratamento com a medicação. Assim, o período de carência foi estimado com os dados obtidos a partir do período de 26 horas após o tratamento.

Figura 16—Gráfico do perfil de depleção residual de OMP e SDM



Para estimar o período de carência mínimo, o FDA recomenda modelar a curva de depleção no sentido de gerar uma reta a partir da transformação dos dados de concentração em função logarítmica. Assim sendo, procedeu-se a regressão linear da fase terminal de depleção dos resíduos de OMP e SDM a partir das concentrações obtidas transformadas pela função logarítmica neperiana (\ln), sendo o gráfico resultante apresentado na Figura 17.

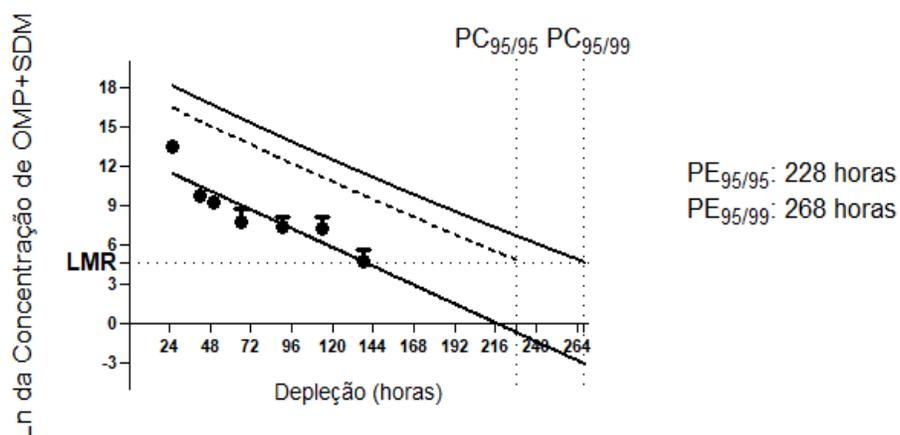
Figura 17- Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual considerando a soma dos resíduos de OMP e SDM: Limite Máximo de Resíduo ($\ln\text{LMR} = 4,6$); (a): reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%



As análises da regressão linear dos dados cinéticos descrevem a depleção residual, muitas vezes, permitindo a estimação do tempo necessário para que a concentração do resíduo atinja uma concentração de referência que, no presente caso, seria o LMR (100 ng g^{-1}). O período de eliminação necessário para que a concentração residual esteja abaixo do LMR é estimado considerando um limite de tolerância, o qual 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 17). Conforme mostra a Figura 18, 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, o

período de carência mínimo seria o de 268 horas, o que corresponderia a 11,2 dias, para o que se recomenda o arredondamento para cima (12 dias). Portanto, o período mínimo estimado para a eliminação de resíduos à níveis de concentração de 100 ng g^{-1} (LMR) quando do uso de OMP+SDM na dose de tratamento de $50 \text{ mg (kgPV)}^{-1}$, via oral, durante um período de 5 dias consecutivos em tilápia, nas condições de temperatura média de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ é de 12 dias.

Figura 18 - Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual (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%.



O desenvolvedor do medicamento Romet 30 informa que o período de carência pode variar entre 5 – 40 dias, dependendo da temperatura da água. O período de carência mínimo estimado a partir dos dados obtidos no presente estudo, 12 dias, está dentro do estipulado pelo desenvolvedor do medicamento Romet 30.

Kosof et al (2007)⁴⁷ realizaram um estudo de depleção utilizando o medicamento Romet 30 em ração medicada na dose de $50 \text{ mg (kgPV)}^{-1}$ por 5 dias em três espécies: picão-verde (15°C), linguado (25°C) e tilápia (30°C) e concluíram que após 10 dias da medicação, não havia resíduos detectáveis na espécie Picão-verde; já na espécie linguado não foram encontrados resíduos das duas substâncias após 21 dias. Para a espécie tilápia, a eliminação foi tão rápida para ambas as substâncias que impossibilitou a detecção das mesmas e impediu a determinação de um período de carência. É importante mencionar que

o método analítico utilizado neste estudo apresentou os limites de quantificação de 300 ng g⁻¹ para OMP e 150 ng g⁻¹ para SDM, o que pode ter contribuído para a não determinação do período de carência em tilápia. Os tempos de abates deste estudo foram de: 1 h, 1d, 6d, 10d, 14d, 21d e 42d, que também pode ter contribuído para que não houvessem pelo menos três períodos de abate em que as concentrações residuais indicassem um perfil terminal de eliminação. Porém, os períodos de carência encontrados por este estudo estão dentro do período estipulado pelo desenvolvedor do medicamento, com exceção da espécie tilápia²². Também é possível concluir que a espécie tilápia, a mesma utilizada neste projeto de estudo, elimina as duas drogas SDM e OMP em um tempo menor que as demais espécies. Fica explícito que para obter resultados palpáveis é necessário desenvolver um método suficientemente sensível e que o delineamento dos tempos de abate contemple períodos mais breves, aumentando as chances de encontrar pelo menos três pontos em que as concentrações residuais indiquem um perfil terminal de eliminação.

Bakal et al (2004)⁴⁹, determinaram as características farmacocinéticas das substâncias SDM e OMP (5:1) em peixe branco (*Morone chrysops x Morone saxitalis*). A meia vida da eliminação para SDM foi de 10,5 horas e de 3,9h pra OMP. Nota-se um período de menor de meia vida para a substância OMP, que não foi o mesmo fato observado neste estudo, pois segundo os gráficos de depleção, é possível notar que OMP tem uma meia vida de eliminação maior que SDM. Tal fato pode ser atribuído às diferentes espécies utilizadas, assim como fatores ambientais. Também é possível notar que neste estudo citado, o coeficiente de correlação demonstrado para ambas as substâncias foi de 0.98, que pode demonstrar que o método utilizado não tem comportamento linear em determinados períodos das medições dos padrões (também é importante mencionar que neste estudo são demonstradas equações utilizadas para a calibração do método que descrevem uma reta, no modelo $y = ax + b$, e que não foi citado o uso de ponderação ou algo do gênero). Uma calibração adequada do método analítico se faz necessária, uma vez que todos os resultados gerados provem dela, sendo assim, uma calibração inadequada pode impactar nos resultados finais do estudo como um todo. Já o estudo realizado neste projeto de mestrado utilizou animais com alta variação do peso corpóreo, que também

pode ter contribuído para variação observada entre os perfis de eliminação de cada substância.

Dessa forma, consideramos os resultados obtidos neste projeto de pesquisa compatíveis com o esperado a partir das informações já divulgadas pelo desenvolvedor do medicamento Romet 30 e também com dados existentes na literatura, mesmo que sejam em outras espécies.

O estudo experimental com os peixes utilizou ração medicada com qualidade controlada e os resíduos foram determinados através de método validado, aumentando a credibilidade dos resultados obtidos. Mais de três tempos de abate se mantiveram dentro do período linear validado no método analítico, sendo assim, dentro do recomendado pelo FDA. O objetivo primário desse projeto foi atingido e o perfil de depleção foi estabelecido, trazendo dados científicos importantes para empresas que pleiteiam registrar o uso destas substâncias no mercado nacional. O período de carência de 12 dias foi determinado, que também pode embasar estudos e ser utilizados para fins de fiscalização.

5. CONCLUSÕES

O processo de revestimento da ração demonstrou-se efetivo e promissor para ser testado com outras substâncias, uma vez que demonstrou relativa homogeneidade e não alterou a fluabilidade da ração. Este procedimento também impediu que as substâncias lixiviassem para a água, mesmo com a afinidade da substância OMP pela água e tornando o produto final mais seguro em questões ambientais.

Os dois métodos analíticos desenvolvidos foram validados e atenderam os parâmetros descritos nos compêndios de referência, sendo assim, harmonizados com a legislação vigente e podendo nortear outros estudos em âmbito comercial, fiscal ou mesmo novos projetos de pesquisa.

O ensaio com os peixes permitiu estabelecer curvas de depleção para SDM e OMP no filé de tilápia (segmento ideal para o consumo). Os resultados deste estudo determinaram que o período mínimo estimado de 12 dias é necessário pra que ocorra a eliminação dos resíduos de SDM + OMP à níveis de concentração aceitáveis, conforme o LMR, quando o tratamento ocorre na

dosagem de 50 mg (kgPV)⁻¹, via oral, durante um período de 5 dias consecutivos, nas condições de temperatura média de 28 °C.

6. REFERÊNCIAS

1. NAPRASNIKOV, A.T. **The evolution of ameliorative nature management in Eurasia**. *Geography and Natural Resources*, 30(2): 181 – 186. 2009.
2. LODEIROS, C. **Aquicultura parte da solução: Alimentos e restauração ecológica**. *Interciencias*; 38(12): 827. 2013.
3. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **The state of world fisheries and aquaculture..** Rome; London. 2018.
4. ASSAD, L. T.; BURSZTYN, M. **AQUICULTURA no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável..** CNPq, Ministério da Ciência e Tecnologia, p. 33-72. 2000.
5. SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS – SEBRAE. **Aquicultura no Brasil, Série Estudos Mercadológicos**. Disponível em: [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/\\$File/5403.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/$File/5403.pdf). Acesso em: Janeiro de 2020.
6. ROSSI, G. A. M. **Importance of Aquaculture in Public Health**. *Continuos Education Jornal in Veterinary and Zootechny of CRM-SP*. São Paulo, Conselho Regional de Medicina Veterinária, 10 (2): 3. 2012.
7. GRUPO INTEGRADO DE AQUICULTURA E ESTUDOS AMBIENTAIS. **Estudo Setorial para a Consolidação da Aquicultura Sustentável no Brasil**. Disponível em: <http://www.fao.org/wairdocs/ap870p/ap870p.pdf#page=26>. Acesso em: Janeiro de 2020.
8. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção da aquicultura do Brasil, das Grandes Regiões e das Unidades da Federação, segundo o tipo de produto da aquicultura**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>. Acesso em: Janeiro de 2020.
9. MOURÃO C. L. **Doenças bacterianas em tilápias do Nilo (oreochromis niloticus) cultivadas em sistema intensivo**. Betim, 2013. Monografia -

- Departamento de Medicina Veterinária. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Disponível em: <http://icbs.pucminas.br/arg/Destaques/pdf/DOEN%C3%87AS%20BACTERI%20ANAS%20EM%20TIL%C3%81PIAS%20DO%20NILO.pdf>. Acesso em Abril de 2017.
10. AMAL, M. N. A; ZAMRI-SAAD, M. **Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review**. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, 34 (2): 195 – 206. 2011.
 11. ASENCIOS Y. O.; AT AL. **First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions**. *Aquaculture Reports*, 4: 74–79. 2016.
 12. BONDAD-REANTASO, M.G., SUBASINGHE, R.P., ARTHUR, J.R., OGAWA, K., CHINABUT, S., ADLARD, R., TAN, Z., SHARIFF, M. **Disease and health management in Asian aquaculture**. *Vet. Parasitol*, 132: 249–272. 2005.
 13. M. REVERTER, N. BONTEMPS, D. LECCHINI, B. BANAIGS, P. SASAL. **Use of plants extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives**. *Aquaculture*, 433: 50-61. 2014.
 14. FIGUEIREDO H. C. P.; LEAL C. A. G. **Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes**. *R. Bras. Zootec.*, 37: 08-14, 2008.
 15. SOTO E. ET AL. **Laboratory-controlled Challenges of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) with *Streptococcus agalactiae*: Comparisons between Immersion, Oral, Intracoelomic and Intramuscular Routes of Infection**. *J. Comp. Path*: 155, 339 e 345. 2016.
 16. ABDELSALAM M. ET AL. 2013. ***Streptococcus dysgalactiae*: An emerging pathogen of fishes and mammals**. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1: 1–6. 2013.
 17. Austin, B; Austin, D.A. **Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish**, 4. ed. Chichester: Springer/Prazis Publishing, 2007.
 18. RICO, A., PHU, T.M., SATAPORNVANIT, K., MIN, J., SHAHABUDDIN, A.M., HENRIKSSON, P.J.G., MURRAY, F.J., LITTLE, D.C., DALSGAARD, A., VAN DEN BRINK, P.J. **Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia**. *Aquaculture*, 412–413: 231–243. 2013

19. RICO, R., ET AL. **Use, fate and ecological risks of antibiotics applied in tilapia cage farming in Thailand.** Environmental Pollution, 191: 8–16. 2014.
20. MIRAND, C.D., ZEMELMAN, R. **Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms.** Sci. Total Environ., 293: 207–218. 2002.
21. SEYFRIED, E.E., NEWTON, R.J., RUBERT, K.F., PEDERSEN, J.A., MCMAHON, K.D. **Occurrence of tetracycline resistance genes in aquaculture. Facilities with varying use of oxytetracycline.** Microb. Ecol., 59: 799–807. 2010.
22. PHARMAQ. **Romet 30 Brochure.** Disponível em: https://www.pharmaq.no/sfiles/5/23/5/file/romet_brochure_english_2014.pdf. Acesso em: Abril de 2017.
23. BULLOCK G. L., STUCKEY H. M., COLLIS D., HERMAN R. L. AND MAESTRONE G. **In vitro and in vivo efficacy of a potentiated sulfonamide in control of furunculosis in salmonids.** Res. Bd. Can., 31: 75-82. 1974
24. R. E. KOSOFF , C-Y. CHEN, G. A. WOOSTER , R. G. GETCHELL, A. CLIFFORD , A. L. CRAIGMILL & P. R. BOWSER. **Sulfadimethoxine and Ormetoprim Residues in Three Species of Fish after Oral Dosing in Feed.** Journal of Aquatic Animal Health, 19: 109–115. 2007
25. BRAD F. DROY, TWINTILLIA TATE, JOHN J. LECH AND KEVIN M. KLEINOW. **Influence of Ormetoprim on the bioavailability, distribution, and pharmacokinetics of Sulfadimethoxine in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*).** Comp. Biochem. Physiol., 94C: 303-307, 1989.
26. CABELLO, F.C. **Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment.** Environ. Microbiol., 8: 1137–1144. 2006.
27. ROMERO, J. FEIJOÓ, C. G. NAVARRETE, P. A. **Antibiotics in aquaculture — use, abuse and alternatives.** In: CARVALHO, E.D., DAVID, J.S., SILVA, R.J. (Eds.), Health and Environment in Aquaculture, 159. 2012
28. EC, European Commission. **Decisão da Comissão de 22 de dezembro de 2003 que altera a Decisão 2002/657/CE relativamente à definição de limites mínimos de desempenho requeridos (LMDR) para determinados resíduos em alimentos de origem animal.** 2004.
29. EMA, 1995. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit. Committee for

- veterinary medicinal products. Note for guidance: Approach towards harmonization of withdrawal periods, EMEA/CVMP/036/95.
30. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMA. **Committee for veterinary medicinal products – Sulphonamides (2)**. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015931. Acesso em: Janeiro de 2020.
 31. THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION. **Table of MRLs for Agricultural Chemicals. Table of MRLs in Foods (Other fish)**. Disponível em: http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/fooddtl.php?f_inq=20200. Dde 2017.
 32. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 14 de 25 de maio de 2009: Aprova os programas de controle de resíduos e contaminantes em carnes (bovina, aves, suína e equina), leite, mel, ovos e pescado para o exercício de 2009. 2009.
 33. ZANELLA, R. et al. **QuEChERS. In: Preparo de amostras para análises de compostos orgânicos**, p. 230-244, 2015.
 34. HASHIMOTO, J.C. et al. **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, v. 95, n.3, p. 913-922, 2012
 35. FDA, 2006. Food and Drug Administration. 2006. Guidance for Industry: General principles for evaluating the safety of compounds used in food-producing animals. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, Rockville, MD, USA. July 25, 2006.
 36. PASCHOAL, J.A.R. et al. **Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos**. Química Nova, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.
 37. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual da garantia da qualidade analítica. 2011.
 38. MAPA, 2011. Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial (CGAL) da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Guia de validação e controle de qualidade: fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários. Brasília: MAPA/ACS. 2011.

39. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. VICH GL49(R): "*Guidance for Industry Studies to Evaluate the Metabolism and Residue Kinetics of Veterinary Drugs in Food-Producing Animals: Validation of Analytical Methods Used in Residue Depletion Studies*". Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, March 2015.
40. SOARES JR, M. S.; CALIARI, M.; CHANG, Y. K. **Substituição de farelo de soja por soja integral em rações extrusadas para aquicultura**. Pesquisa Agropecuária Tropical, v. 34, p. 29 – 37, 2004.
41. Conselho Regional de Medicina Veterinária. Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais – Conceitos e procedimentos recomendados. Brasília, 2013.
42. U.S. National Library of Medicine - NIH. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: . Acesso em: Janeiro de 2020.
43. U.S. National Library of Medicine - NIH. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23418>. Acesso em: Janeiro de 2020.
44. PHU, T. M.; SCIPPO, M. L.; PHUONG, N. T.; TIEN, C. T. K.; SON, H. S.; DALSGAARD, A. **Whithdrawal time for sulfamethoxazole and trimethoprim following treatmet of striped catfish (Pangasianodon hypoththalmus) and hybrid red tilapia (Oreochromis mossambicus x Oreochromis niloticus)**. Aquaculture, v. 437, p. 256 – 262, 2015
45. FAIS A.P., FRANCO R.S.B., SILVA A.F.B., FREITAS O., PASCHOAL J.A.R. **LC-MS/MS methods for sulfadimetoxine and ormetoprim analysis in feed and fish fillet and a leaching study for feed after alternative procedures for the incorporation of drugs**. Food Additives and Contaminants: Part A, 34 (2017), p.501-508.
46. CANTELMO, O. A. et al. **Características físicas de dietas para peixes confeccionadas com diferentes aglutinantes**. Acta Scientiarum, v. 24, n.4, p. 949–955, 2002.
47. KOSOFF R. E. et al. **Sulfadimethoxine and ormetoprim residues in three species of fish after oral dosing in feed**. Journal of Aquatic Heath, v. 29, p. 109 – 115, 2007.
48. POAPOLATHEP A et al. **Sulfadimethoxine in giant freshwater prawns (Macrobrachium rosenbergii): an attempt to estimate the withdrawal time by a population pharmacokinetic approach**. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. v. 40(5): p. 476-485. 2017

49. R. S. BAKAL et al. **Pharmacokinetics of sulfadimethoxine and ormetoprim in a 5:1 ratio following intraperitoneal and oral administration, in the hybrid striped bass (*Morone chrysops* · *Morone saxitalis*)**. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics v. 27, p 1–6, 2004.