



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

LUCIANA DA CONCEIÇÃO CASTELLO BRANCO

Farmacocinética e depleção de resíduos do florfenicol em tabaqui (*Colossoma
macropomum*)

CAMPINAS

2016

LUCIANA DA CONCEIÇÃO CASTELLO BRANCO

FARMACOCINÉTICA E DEPLEÇÃO DE RESÍDUOS DO FLORFENICOL EM
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de doutora em
Ciência de Alimentos.**

Orientador: Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Luciana da Conceição Castello Branco, e orientada pelo professor Dr. Felix Guillermo R. Reyes

Campinas

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

B732f Branco, Luciana da Conceição Castello, 1985-
Farmacocinética e depleção de resíduos do florfenicol em tambaqui
(*Colossoma macropomum*) / Luciana da Conceição Castello Branco. –
Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Felix Guillermo Reyes Reyes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia de Alimentos.

1. Depleção. 2. Farmacocinética. 3. Florfenicol. 4. Florfenicol amine. I.
Reyes Reyes, Felix Guillermo. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Pharmacokinetic and residue depletion of florfenicol in tambaqui
(*Colossoma macropomum*)

Palavras-chave em inglês:

Depletion

Pharmacokinetic

Florfenicol

Florfenicol amine

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Felix Guillermo Reyes Reyes [Orientador]

Vera Lúcia Ferracini

Adriana Pavessi Arisseto Bragoto

Nádia Regina Rodrigues

Marco Antônio de Andrade Belo

Data de defesa: 05-01-2016

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
(Presidente)

Dra. Vera Lúcia Ferracini
(Membro)

Dra. Adriana Pavesi Arisseto Bragoto
(Membro)

Prof. Dra. Nádia Regina Rodrigues
(Membro)

Dr. Marco Antônio de Andrade Belo
(Membro)

Dra. Fabiana Pilarski
(Suplente)

Dra. Edsandra Campos Chagas
(Suplente)

Dra. Regina Prado Zanes Furlani
(Suplente)

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros, encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico este trabalho,

- a Deus, por seu amor incondicional;

*- a minha família: meus pais Tamara e
Rodolpho, irmãos Lucila e Igor, pelo amor,
compreensão e carinho ao longo de toda a
caminhada;*

*- ao meu marido, amigo e companheiro, pelo
exemplo e por me confortar e me acalmar nos
momentos difíceis.*

Agradecimentos

agradeço ao Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes pelas orientações conferidas ao longo do trabalho, oportunidade do convívio e o imenso aprendizado profissional;

à Dra. Fabiana Pilarski e Edsandra Campos Chagas, pela confiança e generosidade ao longo do desenvolvimento do trabalho;

aos membros da banca pelas valiosas sugestões: Dra. Vera Lúcia Ferracini, Dra. Adriana Pavessi Ariseto Bragoto, Dra. Nádia Regina Rodrigues, Dr. Marco Antônio de Andrade Belo, Dra. Fabiana Pilarski, Dra. Regina Prado Zanes Furlani e Dra. Edsandra Campos Chagas;

à Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP;

à Capes, pela concessão da bolsa de estudos;

ao Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, pela condução do experimento com os peixes;

ao Laboratório de Piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, em especial à Pesquisadora Edsandra Campos Chagas que com sua serenidade e dedicação, me auxiliou na condução dos experimentos;

ao Laboratório de Resíduos e Contaminantes, da EMBRAPA Meio Ambiente, e seus funcionários por disponibilizarem não somente seus equipamentos, mas também seus conhecimentos e sabedoria;

às amigas Michelle Del Bianchi, Rayssa Cardozo, Juliana Teles, Silvia Helena e Patricia Braga, por serem instrumento de Deus em minha vida.

Aos funcionários da UNICAMP “Marcão”, Cosme e Marquinhos, pela ajuda, sugestões, amizade e paciência;

à todas as pessoas que não foram mencionadas e que de alguma forma auxiliaram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!!

Luciana Castello Branco

RESUMO GERAL

A aquicultura é um sistema de produção agropecuário que mais cresce no mundo e apresenta grande potencial de expansão. Dentre os sistemas de provimento de alimentos protéicos, é o que apresenta maior potencial de expansão, e com alto valor nutritivo. O Brasil apresenta elevado potencial para expansão da aquicultura: uma costa litorânea de 8,4 mil quilômetros, 5,5 milhões de hectares de reservatórios de águas continentais, clima favorável, terras disponíveis, mão de obra abundante e crescente mercado interno. Dentre as espécies com potencial produtivo, destaca-se o tambaqui (*Colossoma macropomum*), que atualmente é a segunda espécie de peixe de águas continentais mais criada no Brasil, e é a espécie nativa da região amazônica com maior expressão produtiva. Em pisciculturas intensivas, maximizam-se os recursos produtivos com o aumento do adensamento populacional favorecendo a difusão de doenças entre os animais. Estudos para o efetivo e correto tratamento de enfermidades que acometem os peixes em sistemas intensivos de produção, são de elevada importância. No Brasil, existem unicamente dois fármacos aprovados para utilização na aquicultura, são eles o florfenicol e a oxitetraciclina. O florfenicol (FF) é um antimicrobiano da família dos anfenicóis, que apresenta amplo espectro de ação, sendo muito eficaz no tratamento de infecções bacterianas. Sua utilização no Brasil é aprovada para tilápias (*Oreochromis niloticus*) e trutas (*Oncorhynchus mykiss*), sendo necessário a realização de estudos para utilização em espécies nativas. Assim, este trabalho contribui com o desenvolvimento e expansão da aquicultura no país, através do estudo da farmacocinética e depleção de resíduos do FF em tambaqui, após sua administração via ração medicada. O perfil farmacocinético foi obtido pela administração de FF em dose única (21,0 mg/kg de peso vivo - pv), através da ração, e posterior análise do plasma dos animais. O período de depleção foi determinado pela administração de FF, simulando o tratamento da doença, sendo administrado 10 mg/kg de pv, por 10 dias, e posterior análise do músculo dos animais. Foram desenvolvidos e validados métodos analíticos para determinação de FF na ração medicada e de FF e de seu metabólito, o florfenicol amina (FFA), no plasma e músculo. Pode-se concluir que para o tambaqui, o FF apresentou potencial para tratamento das principais bacterioses que acometem a espécie, e que o período de carência após 10 dias de tratamento, foi menor do que 24 horas.

ABSTRACT

Aquaculture is a system of production that has been growing considerably throughout the entire world. Among the systems of providing protein-based food, it is the one that presents the highest potential for expansion, with high nutritional value. Brazil shows elevated potential for expansion in aquaculture: having a coastline of 8.4 thousand kilometers, 5.5 million hectares of inland water reserves, favorable weather conditions, available land, an abundance in laborers and a growing internal market. Among the species with potential production, the tambaqui (*Colossoma macropomum*) stands out. It is currently the second most raised inland water fish in Brazil, and is one of the native species to the Amazon region with the highest production expression. The intensive systems of production bring them the factor of proximity between the animals and a possibility of higher propagation of diseases among themselves. Studies about the effective and correct treatment of illnesses that affect the fish in intensive production are of elevated importance. In Brazil, only two drugs are approved for use in aquaculture, florfenicol (FF) and oxytetracycline. FF is a broad-spectrum antibiotic of the anphenicol family, which is very effective in the treatment of bacterial infections, mainly those that affect fish farms. Its use in Brazil is approved for tilapias and trouts. Thus, in order to use it on native species studies are necessary. Therefore, this study aimed to contribute to the development and expansion of fish farming in the country, through the study of the pharmacokinetics and depletion of FF residues in tambaqui, after its administration via medicated feed. The pharmacokinetic profile was obtained administering FF in a single dose (21 mg/kg body weight - bw), by the feed, and a posterior analysis of the animal's plasma. The depletion period was determined by administering FF, simulating the treatment of a disease, being administered 10 mg/kg bw, for 10 days, and a posterior analysis of the animal's muscles. It can be concluded that for the tambaqui, FF showed potential for the treatment of the main bacteria that attack the species, and that the withdrawal period, after 10 days of treatment, is less than 24 hours.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I. Considerações sobre o uso do Florfenicol na piscicultura e aspectos analíticos na sua determinação em pescado

- Figura 1.** Produção mundial aquícola no período de 2007 a 2014. 26
- Figura 2.** Crescimento da produção mundial de carne no período de 2012 a 2014. 27
- Figura 3.** Tambaqui (*Colossoma macropomum*), utilizado nos ensaios experimentais. 31

CAPÍTULO II. Florfenicol e florfenicol amina em plasma de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

- Figura 1.** Estrutura química do florfenicol (A) e do seu metabólito principal, a florfenicol amina (B). 53
- Figura 2.** Fluxograma da marcha analítica para a determinação de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) em plasma de tambaqui. 56
- Figura 3.** Cromatograma típico de florfenicol amina (FFA) e florfenicol (FF) na concentração de 40 µg/mL em ACN, em coluna Xterra RP18, de 5µm (4,6x150 mm). 61
- Figura 4.** Cromatogramas da ração branco (A) e ração medicada (B) na concentração de 250 mg/kg. 63
- Figura 5.** Curva matrizada de florfenicol (FF) na ração medicada. 63
- Figura 6.** Cromatogramas da matriz de plasma branco (A) e matriz de plasma branco fortificada com florfenicol e florfenicol amina (B) na concentração de 0,03 e 0,05 µg/mL, respectivamente. 65
- Figura 7.** Curvas matrizadas do florfenicol (A) e florfenicol amina (B) no plasma. 66
- Figura 8.** Concentração de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA), em plasma de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após administração, via oral através de ração medicada, de 21,0 mg de FF/kg de peso vivo. 69

CAPÍTULO III. Depleção de resíduos do florfenicol e florfenicol amina em músculo de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

- Figura 1.** Estrutura química e massa molecular do florfenicol (A) e da florfenicol amina (B). 80
- Figura 2.** Preparo da amostra para determinação de florfenicol e florfenicol amina em músculo de tambaqui. 84
- Figura 3.** Cromatograma típico de FFA e FF na concentração de 1 µg/g em ACN, em coluna Xterra Rp18 de 5µm (4.6x150 mm). 87
- Figura 4.** Recuperação do florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA), utilizando 5 g de amostra e 5 mL de solução tampão McIlvaine, em diferentes pHs. 89
- Figura 5.** Cromatogramas da matriz de músculo de tambaqui isenta (branco) de FFA (A) e FF (B) e matriz branco fortificada com FFA (C) e FF (D) na concentração do LOQ (µg/mL). 90
- Figura 6.** Curvas analíticas matrizadas do FF (A) e FFA (B), em músculo de tambaqui (*Colossoma macropomun*). 90
- Figura 7.** Concentração da somatória de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA), após administração de FF por via oral (10 mg/kg peso vivo), por 10 dias, em tambaqui (*Colossoma macropomun*) (n=10). 94

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I. Considerações sobre o uso do Florfenicol na piscicultura e aspectos analíticos na sua determinação em pescado

Tabela 1.	Limites máximos de resíduo (LMR) para o florfenicol (FF), estabelecidos por agências de regulamentação.	28
Tabela 2.	Farmacocinética de florfenicol (FF), em diferentes espécies de peixes.	35
Tabela 3.	Métodos de Extração de FF e FFA, em pescado.	38

CAPÍTULO II. Florfenicol e florfenicol amina em plasma de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Tabela 1.	Composição da fase móvel e gradiente utilizado.	57
Tabela 2.	Formulação da ração medicada.	59
Tabela 3.	Parâmetros de validação do método para a determinação de florfenicol (FF) na ração medicada.	62
Tabela 4.	Parâmetros de validação do método para a determinação de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) em plasma de tambaqui (<i>Colossoma macropomun</i>).	67
Tabela 5.	Concentração de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) em plasma de tambaqui após administração via oral de 21,0 mg de FF/kg de peso vivo (n=10).	68
Tabela 6	Parâmetros farmacocinéticos determinados no plasma após única administração oral de florfenicol (FF) (21,0 mg/kg pv) em tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) (n=10).	69

CAPÍTULO III. Depleção de resíduos do florfenicol e florfenicol amina em músculo de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Tabela 1.	Fragmentos de massas monitoradas na determinação de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) por espectrometria de massas (HPLC -MS/MS - IonTrap).	85
Tabela 2.	Parâmetros cromatográficos de conformidade do sistema cromatográfico obtidos para florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA).	88
Tabela 3.	Parâmetros de validação do método analítico para determinação de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) em músculo de tambaqui.	91
Tabela 4.	Concentração de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) em músculo de tambaqui (n=10) após administração via oral através de ração medicada, de 10 mg de FF/kg de pv, durante 10 dias.	93

ANEXOS

Anexo 1.	Aprovação do Comitê de Ética / UNICAMP - IB	108
Anexo 2.	Autorização da EMBRAPA – Amazônia Ocidental	109

Lista de abreviaturas e siglas

ACN:	Acetonitrila
ANVISA:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C ₁₈ :	Octadecil
CAUNESP:	Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista
CEUA:	Comitê de Ética no Uso de Animais
MIC:	Concentração Inibitória Mínima <i>Maximun inhibitory concentration</i>
C _{máx} :	Concentração máxima
HPLC:	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
CV:	Coeficiente de Variação
DP:	Desvio Padrão
EC:	<i>European Commission</i>
EMA:	<i>European Medicines Agency</i>
FAO:	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
FLU:	Fluorescência
ha	hectare
K _e :	Constante de eliminação
LC:	<i>Liquid Chromatography</i>
LMR:	Limite Máximo de Resíduo
LOD:	Limite de detecção
LOQ:	Limite de quantificação
MAPA:	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MPA:	Ministério da Pesca e Aquicultura
MS/MS:	Espectrometria de massas sequencial
pv:	Peso vivo
PVDF:	Difluoreto de polivinilideno
SDS:	Dodecil Sulfato de Sódio <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SPE:	Extração em fase sólida <i>Solid Phase Extraction</i>

$T_{\text{máx}}$: Tempo máximo
 $T_{1/2}$ vida: Tempo de meia vida
TEA: Trietilamina
Triethylamine
Vd: Volume de distribuição
UA: Unidade de área
UV Ultravioleta

SUMÁRIO

Introdução geral	18
Referências Bibliográficas	19
Capítulo I. Revisão Bibliográfica: Considerações sobre o uso de florfenicol na produção de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) e aspectos analíticos na sua determinação em pescado	21
Capítulo II. Florfenicol e florfenicol amina em plasma de tambaqui (<i>Colossoma</i>)	49
Capítulo III. Florfenicol e florfenicol amina em músculo de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	77
Discussões Gerais	100
Referências Bibliográficas	103
Conclusão Geral	107

CAPÍTULO I. Revisão Bibliográfica: Considerações sobre o uso de florfenicol na piscicultura e aspectos analíticos na sua determinação em pescado

Resumo	22
Abstract	23
Introdução	24
Aspectos econômicos da aquicultura	26
Uso de florfenicol na piscicultura	28
Ação, distribuição e biotransformação do florfenicol	29
Tambaqui	31
Doenças bacterianas em tambaqui	32
Importância de ensaios farmacocinéticos e de depleção de resíduos	33
Determinação de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) em pescado	37
Considerações finais	40
Referências Bibliográficas	41

CAPÍTULO II. Florfenicol e florfenicol amina em plasma de tambaqui (*Collossoma macropomum*)

Resumo	50
Abstract	51
Introdução	52
Materiais e Métodos	54
Solventes e reagentes	54
Preparo de soluções	55
Equipamentos	55
Preparo da amostra para determinação de florfenicol em ração	55
Preparo da amostra para determinação de FF e FFA no plasma	56
Condições do sistema cromatográfico (HPLC-FLU)	56
Validação dos métodos analíticos	57
Preparo da ração medicada	59
Peixes e condições experimentais	59
Resultados e Discussão	60
Otimização da separação cromatográfica	60
Desenvolvimento e validação do método analítico para determinação de FF na ração	61
Desenvolvimento e validação do método analítico para determinação de FF e FFA no plasma	65
Análise da ração medicada e dose administrada no ensaio farmacocinético	68
Análise do plasma	68
Conclusões	72
Referências bibliográficas	72

CAPÍTULO III. Florfenicol e florfenicol amina em músculo de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Resumo	78
Abstract	79
Introdução	80
Material e Métodos	82
Solventes e reagentes	82
Preparo de soluções	83
Equipamentos	83
Método de determinação do florfenicol na ração medicada	83
Determinação de FF e FFA no músculo de tambaqui	83
Condições do sistema HPLC-MS/MS	84
Validação do método analítico	85
Preparo da ração medicada	86
Peixes e condições experimentais	86
Resultados e Discussão	87
Otimização do preparo da amostra	87
Validação do método analítico para determinação de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) em músculo	89
Análise da ração utilizada no ensaio de depleção	92
Depleção de resíduos de florfenicol (FF) no músculo	92
Conclusões	95
Referências bibliográficas	95

INTRODUÇÃO GERAL

A produção aquícola mundial é uma atividade econômica que vem apresentando elevado crescimento. Dentre os sistemas de provimento de alimentos protéicos é o que apresenta maior potencial de crescimento, em comparação a outros sistemas como o bovino, suíno e a avicultura (FAO, 2014). O Brasil apresenta um enorme potencial de expansão deste tipo de criação, pois apresenta uma ampla faixa costeira e muitas bacias hidrográficas continentais, além de clima adequado e temperatura constante a maior parte do ano (Brasil, 2012).

Os sistemas intensivos de produção caracterizam-se por criar os peixes em altas densidades populacionais. A proximidade dos animais, acúmulo de excretas e pior qualidade de água, facilitam a disseminação de doenças, principalmente as bacterioses, que são as principais doenças que acometem peixes de águas continentais. As bacterioses mais comumente encontradas em tilápias e trutas são causadas por *Flavobacterium columnare* (Pilarski et al., 2008), *Aeromonas* sp (Merino et al., 1995), e *Streptococcus agalactiae* (Figueiredo et al., 2012).

O florfenicol (FF) é um antimicrobiano utilizado mundialmente para o tratamento de bacterioses na piscicultura. Este fármaco apresenta amplo espectro de ação contra bactérias *gram* positivas e *gram* negativas. É da família dos anfenicóis e apresenta-se muito eficaz no tratamento de bacterioses, com a vantagem de não causar anemia aplásica, como ocorria com a utilização do cloranfenicol (Chang et al., 2010). O FF é aprovado para uso na piscicultura no Brasil, em tilápia e seus híbridos e truta arco-íris, sendo seu período de carência, determinado pelo fabricante, de 14 dias. O limite máximo de resíduo (LMR) permitido para músculo de pescado, estabelecido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), é de 1000 µg/kg (Brasil, 2012).

A florfenicol amina (FFA) é o principal metabólito da biotransformação do FF em pescado. Alguns países e organizações internacionais estabelecem o LMR não somente para o FF, e sim para a soma de resíduos de FF e FFA (EMEA, 1999).

O medicamento veterinário contendo FF, comercializado no Brasil é somente indicado para criação de tilápias e trutas, sendo que não se encontra na literatura estudos de farmacocinética e depleção de resíduos em peixes nativos da região amazônica.

No Brasil, a espécie nativa de peixe mais criada é o tambaqui (*Colossoma macropomum*). Sua produção responde pelo segundo lugar da produção total de peixes de águas continentais do país, perdendo apenas para a produção de tilápia (Brasil, 2013). Sua

produção é de grande importância econômica, sendo muito relevante o desenvolvimento de estudos para aprimorar e favorecer o desenvolvimento deste tipo de criação.

Estudos de farmacocinética e depleção de resíduos do FF realizados em tilápia e truta, relatados na literatura, indicam uma rápida eliminação deste fármaco no músculo dessas espécies. Porém, estudos realizados com tambaqui não existem. Esta espécie necessita de elevadas temperaturas (26 – 32 °C), e sua alimentação é frugívora e onívora (Dairiki & Silva, 2011). As diferenças metabólicas desta espécie pode influenciar na farmacocinética do FF, alterando a biotransformação e distribuição e, conseqüentemente, o período de carência do fármaco.

Em vista do que foi apresentado, o presente trabalho teve como objetivo o estudo farmacocinético (no plasma) e de depleção de resíduos (no músculo) do FF em tambaqui, após sua administração por via oral (pela ração). Para tanto, foram desenvolvidos e validados métodos analíticos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FLU) para quantificação do FF na ração medicada, e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um analisador de massas (HPLC-MS/MS) para quantificação do FF e FFA no plasma e músculo.

Referências Bibliográficas

- Brasil, 2012. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2011-2012%20-%20Publica%C3%A7%C3%A3o%20PNCRC%202012%20em%2022-05-2012.pdf>. Acessado em 08.06.2015.
- Brasil, 2013. Ministério da Pesca e Aquicultura. Disponível em <<http://www.mpa.gov.br/#aquicultura/informacoes/potencial-brasileiro>>. Acessado em 08.06.2015.
- Chagas, E.C.; Val, A.L. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 397-402, 2003.
- Chang, S.K.; Davis, J.L.; Cheng, C.N.; Shien, R.H.; Hsieh, M.K.; Koh, B.W.; Chou, C.C. Pharmacokinetics and tissue depletion of florfenicol in Leghorn and Taiwan Native chickens. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**, v. 33, p. 471-479, 2010.

- Dairiki, J.K.; Silva, T.B.A. Revisão de literatura: exigências nutricionais do tabaco – compilação de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros. Manaus. EMBRAPA Amazônia Ocidental, Documento 91, 44 p, 2011.
- EMA, 1999. European Medicines Agency. Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. **Florfenicol (extension to chicken), Summary Report, EMA/ MRL/589/99-FINAL, 1999.**
- FAO, 2014. Food and Agriculture Organization of United Nations. Food Outlook: Biannual Report on Global Food Markets. Disponível em <<http://www.fao.org/3/a-i4136e.pdf>>. Acessado em 20.11.2015.
- Figueiredo, H.C.P.; Nobrega Netto, L.; Leal, C.A.G.; Pereira, U.P.; Mian, G. F. Streptococcus iniae outbreaks in Brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 576-580, 2012.
- Merino, S.; Rubires, X.; Knochel, S.; Tomás, J.M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of food microbiology**, v. 28, p. 157-168, 1995.
- Pilarski, F.; Rossini, A.J.; Ceccarelli, P.S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* from four tropical fish species in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 631-637, 2008.

CAPÍTULO I

Revisão bibliográfica:

Considerações sobre o uso do Florfenicol na piscicultura e aspectos analíticos na sua determinação em pescado

Considerações sobre o uso de Florfenicol na piscicultura e aspectos analíticos na sua determinação em pescado

RESUMO

A piscicultura é uma atividade econômica que vem apresentando elevado crescimento, e os antimicrobianos são utilizados mundialmente para o tratamento de bacterioses. O florfenicol (FF) é um fluorato derivado do tianfenicol, sendo muito eficaz no tratamento de infecções bacterianas. No Brasil, seu uso na criação de peixes está aprovado desde 2008, destinado à tilápia e truta. Devido à grande diversidade de espécies de peixes nativos existentes, e a necessidade de combater bacterioses nos mesmos, assim como na criação de tilápias e de trutas, há a necessidade de estudos para avaliar o uso do FF nessas outras espécies. No Brasil, o tambaqui é a espécie nativa da região amazônica mais criada, e que apresenta boa capacidade produtiva. Neste contexto, a presente revisão contextualiza o uso do FF no tratamento de peixes e os estudos farmacocinéticos e de depleção de resíduos realizados em pescado. Também é apresentada uma revisão dos métodos analíticos disponíveis na literatura, para a determinação de FF e FFA em pescado.

Palavras-chave: Métodos analíticos, Resíduos, Florfenicol, Florfenicol Amina, Tambaqui.

Considerations on the use of Florfenicol in fish farming and analytical aspects of its determination in fish

Abstract

Fish farming is an economical activity that has shown elevated growth, and antibiotics are used worldwide for the treatment of bacterial infections, mainly diseases that attack inland water fish. Florfenicol (FF) is a fluorate derived from tianfenicol, being very effective in the treatment of bacterial infections. In Brazil, its use on tilapia and trout fish farming has been approved since 2008. Due to the great diversity of existing native species, and the necessity of combating bacterial infections in these species, just as in the production of tilapia and trout, there is a necessity for studies to evaluate the use of FF in these other species. In Brazil, the tambaqui is the most produced native specie from the Amazon region, and represents a good potential production. With this in mind, the present revision aims to contextualize the use of FF, the pharmacokinetic and residue depletion studies in fish. A revision of the analytical methods available in the literature for the determination of FF and florfenicol amine (FFA) in fish is also presented.

Key words: Analytical method, Residues, Florfenicol, Florfenicol amine, Tambaqui.

Introdução

O crescimento da população mundial tem preocupado os órgãos governamentais no que diz respeito ao provimento de alimentos para abastecer essa população, que hoje se encontra com mais de sete bilhões e estima-se que sejamos mais de 10 bilhões até o final do século XXI (INED, 2013).

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2011a), o Brasil é um dos poucos países do mundo que pode ampliar a produção de alimentos com ganhos reais de produtividade e mantendo a salvo suas reservas naturais.

Um dos sistemas de produção de alimentos proteicos, com maior potencial de desenvolvimento no mundo, e em especial no Brasil, é a piscicultura. Todavia, os maiores produtores de pescado se encontram no continente asiático, onde se iniciou séculos atrás a criação de organismos aquáticos, sendo que a América é o segundo continente com maior produção de organismos aquáticos (FAO, 2011).

A piscicultura representa aproximadamente 50% da produção aquícola mundial, sendo a carpa e a tilápia as espécies de águas continentais mais produzidas.

O Brasil poderá se tornar um dos maiores produtores de pescado do mundo até 2030, com condições de atingir a produção de 20 milhões de toneladas, sendo um dos poucos países que tem condições de atender à crescente demanda mundial por produtos de origem pesqueira, através da aquicultura. Isto se deve ao potencial hídrico do país, com extenso litoral marinho e grandes bacias de águas continentais (Brasil, 2011b).

No Brasil, a tilápia e o tambaqui são as espécies que respondem pelas maiores produções da aquicultura continental, 67%, e merecem destaque também a produção do tambacu (resultado do cruzamento entre tambaqui e pacu), carpa e pacu, que respondem por 20,1% da produção aquícola continental (Brasil, 2011b).

O sistema intensivo de produção do tambaqui vem crescendo de maneira acelerada e, até o presente momento, é a principal espécie nativa da região amazônica criada no Brasil. Sua produção cresceu 139,1% no período de 2009 a 2011, enquanto a pesca extrativa apresentou um crescimento de 4,7% no mesmo período (Brasil, 2011b).

As práticas agrícolas em sistemas de criação intensiva, caracterizadas pelas altas densidades populacionais, propiciam problemas nutricionais e de enfermidades infecciosas e parasitárias, de grande preocupação na piscicultura. A facilidade de transmissão de doenças e a proximidade dos animais em sistemas intensivos e semi-intensivos facilitam a disseminação dessas doenças as quais representam um dos principais obstáculos sanitários e produtivos

(Malta et al., 2001; Silva, 2001). Sendo assim, a utilização de antimicrobianos se faz necessária, para o tratamento de doenças.

No Brasil existem unicamente dois antimicrobianos aprovados para uso na aquicultura, o florfenicol (FF) e a oxitetraciclina. O FF é um antimicrobiano sintético de amplo espectro desenvolvido especialmente para uso veterinário. É derivado do tianfenicol, que contém um átomo de flúor no carbono três ao invés do grupo hidroxila (Graham et al., 1988). Esta substituição promoveu maior espectro de ação antibacteriana, ausência de inconvenientes de resistência bacteriana e não causa anemia aplásica nos animais, como o cloranfenicol.

Na aquicultura, o FF é indicado para o tratamento de bacterioses causadas por *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas* sp, estreptococose, causada pela bactéria *Streptococcus agalactiae*, sendo também indicado para o tratamento da doença da boca vermelha, causada pela bactéria *Yersinia ruckerii* em truta arco-íris (Bowker et al., 2010).

Frequentemente, observa-se nas diversas espécies animais que um mesmo medicamento, administrado na mesma forma farmacêutica, resulta em diferenças nos processos farmacocinéticos (absorção, distribuição e eliminação). Mesmo dentro de uma mesma espécie, quando adaptados a condições diferentes, notam-se variações. Assim, é fundamental a realização de estudos de farmacocinética para todas as espécies ao qual o fármaco se destina, para se conhecer a concentração, velocidade de absorção, bem como o tempo que o fármaco estará presente nos tecidos do animal submetido ao tratamento.

Com foco na segurança de alimentos, esses estudos auxiliam na determinação do período de carência, para posterior comercialização. E para tanto, métodos cromatográficos são amplamente utilizados, visto os baixos limites de detecção e quantificação requeridos para atender ao limite máximo de resíduo permitido.

Na literatura, são relatados diversos métodos analíticos para determinação de FF em produtos alimentícios, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência associada a detectores de ultravioleta (Wrzesinski et al., 2006; Feng et al., 2008; Gaikowski et al., 2010; Zhao et al., 2010; Xie et al., 2012b), PDA (Anadón et al., 2008), fluorescência (Jiancheng et al., 2006; Pouliquen et al., 2005; Xie et al., 2011; Ansari et al., 2012; Xie et al., 2012a) ou, ainda, associada à espectrometria de massas (LC-MS) (Lim et al., 2010; Pengjie et al., 2010).

Com base na importância deste fármaco para a produção animal, a presente revisão contextualiza o uso de FF no tratamento de doenças em peixes, assim como os estudos farmacocinéticos e de depleção de resíduos realizados em peixes. Também é apresentada uma

revisão dos métodos analíticos disponíveis na literatura, para determinação de FF e FFA em pescado.

Aspectos econômicos da aquicultura

O crescimento populacional segundo estimativas da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 2011), será maior nos países em desenvolvimento e menor nos desenvolvidos. O Brasil se encontra entre os países mais populosos do mundo perdendo apenas para a China, Índia, Estados Unidos e Indonésia (UNICEF, 2014). Juntos estes países representam quase a metade da população mundial.

De acordo com o último relatório da FAO (2014a), “The State of World Fisheries and Aquaculture” (SOFIA), a aquicultura apresenta um enorme potencial para responder à crescente demanda mundial por alimentos, decorrente do crescimento da população global, contribuindo ainda para a segurança alimentar e proporcionando uma produção mais sustentável. No período de 2007 a 2014, sua produção cresceu mais do que a captura (Figura 1).

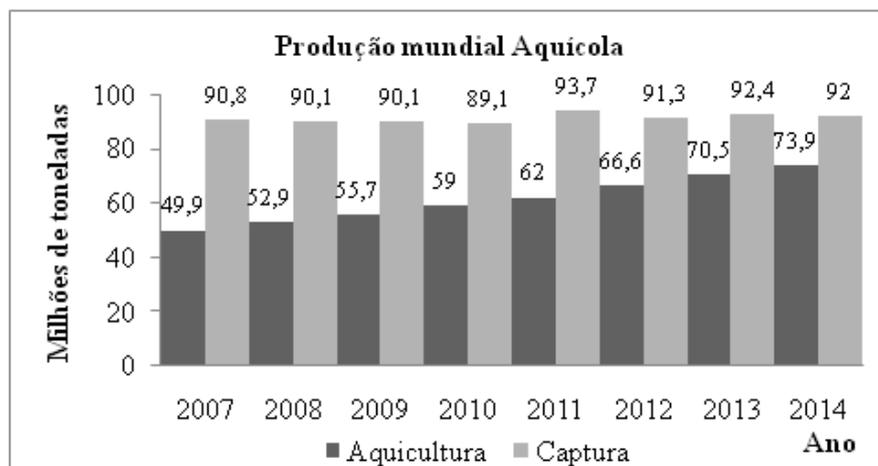


Figura 1. Produção mundial aquícola no período de 2007 a 2014.

Fonte: FAO (2014a).

Os maiores produtores de organismos aquáticos no mundo estão localizados no continente asiático: China, Indonésia e Índia (Brasil, 2011b). O mesmo continente detém mais de 66% de toda a produção mundial. Seguida da Ásia, a América é o segundo continente com maior produção de organismos aquáticos com aproximadamente 13% da produção mundial. Destacam-se os Estados Unidos, Peru, Chile, México, Brasil e Argentina (FAO, 2014a).

O Brasil é um dos poucos países do mundo que pode ampliar a produção de alimentos com ganhos reais de produtividade e mantendo a salvo suas reservas naturais. Ainda neste país, a aquicultura vem se expandindo de forma sustentável, e atualmente é o segmento onde mais se implantam projetos, atuando como uma forma alternativa de maior viabilidade para o suprimento da demanda por alimentos proteicos (SEBRAE, 2008).

A produção de organismos aquáticos foi, dentre os sistemas de produção de proteína o que apresentou maior crescimento entre os anos de 2012 à 2014 (Figura 2). Cabe ainda mencionar que a aquicultura é um dos poucos sistemas produtivos, com capacidade real de expansão, além de apresentar alta taxa de conversão alimentar.

A produção de carne, leite e ovos leva a uma enorme perda de calorias cultivadas em campos, uma vez que os cereais e as sementes de oleaginosas têm de ser cultivadas para alimentar os animais. De acordo com cálculos do Programa das Nações Unidas para o Meio ambiente, as calorias que são perdidas pela alimentação de animais com cereais, na atual produção, poderia teoricamente, alimentar 3,5 bilhões de pessoas. Cada espécie apresenta uma taxa de conversão alimentar ideal: dois quilos de cereais produzem um quilo de frango, três quilos produzem um quilo de carne suína e sete quilos são necessários para a produção de um quilo de carne bovina (Bertol et al., 2001; Perotto et al., 2000; Rocha et al., 2003). A produção de peixes apresenta elevada taxa de conversão, 1,5 a 2,0 quilos de cereais produzem um quilo de pescado, assim como a de frango (Oliveira et al., 2006).

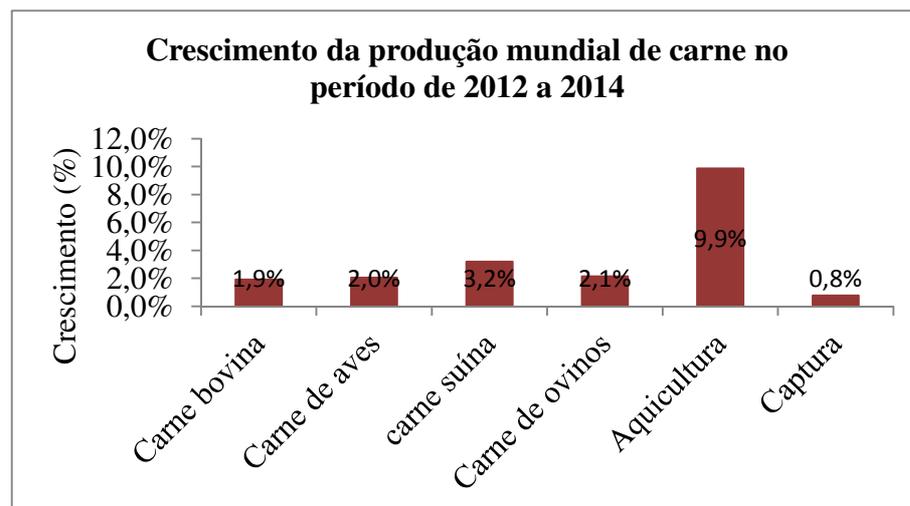


Figura 2. Crescimento da produção mundial de carne no período de 2012 a 2014.

Fonte: FAO, 2014b.

Uso de florfenicol na piscicultura

O FF é um antimicrobiano sintético destinado à medicina veterinária, que apresenta amplo espectro de ação contra bactérias *gram* positivas e *gram* negativas. É um derivado do tianfenicol, que contém um átomo de flúor no carbono três ao invés do grupo hidroxila encontrado no tianfenicol (Chang et al., 2010). Essa substituição modificou completamente as características da molécula, dando lugar a uma combinação precisa de amplo espectro, segurança e ausência de inconvenientes de resistência bacteriana, o que tornou o antimicrobiano significativamente mais atrativo do que o cloranfenicol, que causa anemia aplásica nos animais (Schmid, 1983).

Diversos países têm essa molécula aprovada para utilização na aquicultura e estabeleceram LMR para esta substância em pescado, conforme Tabela 1. Pode-se observar que este limite é determinado pela soma de resíduos de FF e de florfenicol amina (FFA), seu metabólito majoritário (EMEA, 1997; EMEA, 1999).

Tabela 1. Limites máximos de resíduo (LMR) para o florfenicol (FF), estabelecidos por agências de regulamentação.

Animal	Matriz	MAPA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	EMA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Health Canada ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	USDA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Peixes (Pescado)	músculo	1000	-	-	-
Peixes (Pescado)	pele e músculo [◇]	-	1000*	-	1000*
Camarão	-	1000	-	-	-
Salmonídeos	músculo	-	-	800	-

Legenda: MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento; EMA – European Medicines Agency; USDA – United States Departamento f Agriculture; *Soma de todos os metabólitos; [◇]Em proporções naturais.

Na aquicultura, o FF é indicado para o tratamento da septicemia hemorrágica bacteriana, causada pela bactéria *Aeromonas* sp e para a estreptococose, causada pela bactéria *Streptococcus agalactiae* em várias espécies de tilápia e seus híbridos. Também é indicado para o tratamento da doença da boca vermelha, causada pela bactéria *Yersinia ruckerii* em truta arco-íris (MSD, 2015). Sua via de administração para o tratamento de doenças em peixes é oral, através da sua dissolução em óleo visto sua baixa solubilidade em água e, posterior

homogeneização com a ração. Como este fármaco apresenta baixa solubilidade em água, apresenta-se como um fator positivo, haja visto que poderia haver perdas do fármaco no momento da administração, quando em contato com a água. A administração por via intramuscular ou ainda a intravenosa tornaria a terapêutica muito mais onerosa e dispendiosa. Deve-se ainda ser levado em consideração que o manejo de peixes, quando comparado a outras espécies de animais como bovinos, suínos e aves, precisa ser delicado visto a fragilidade desses animais e habitat diferente. A aplicação individual de medicamentos promove estresse elevado, visto a retirada do animal do habitat natural, da hipóxia, do contato com anestésicos e da manipulação humana. Estas condições promovem alterações na homeostase do animal, diminuindo sua resistência natural e, conseqüentemente, aumentando a sua suscetibilidade a doenças. Tratando-se de animais que já apresentam bacterioses e, portanto, se encontram debilitados, uma situação de estresse intenso poderia causar a morte dos animais e perdas na produção evidenciando a vantagem da administração por via oral, para este tipo de animal.

A dose recomendada pelo fabricante do medicamento veterinário contendo FF é de 10 mg/kg de peso vivo (pv). Encontram-se na literatura alguns artigos de estudo de farmacocinética e depleção de FF que utilizam esta mesma dose (Martinsen et al., 1993; Hosberg et al., 1994; Lewbart et al., 2005; Wrzesinski et al., 2006; Feng et al., 2008; Feng et al., 2009; Gaikowski et al., 2010; Salvo et al., 2013). Porém, encontram-se também artigos com doses de 40 mg/kg de pv (Zhao et al., 2010), 20 mg/kg de pv (Park et al., 2006; Lim et al., 2010; Xie et al., 2012b), 15 mg/kg de pv (Gaunt et al., 2010) e ainda na dose de 5 mg/kg de pv (Lim et al., 2010).

A concentração mínima inibitória de FF para as principais bacterioses em peixes varia de 0,25 a 4 µg de FF por mL de plasma (Gaunt et al., 2011). Verifica-se que em todos os artigos citados acima, esta concentração apesar da variação nas doses administradas, é atingida.

Ação, distribuição e biotransformação do florfenicol

A ação do FF decorre da sua ligação com as subunidades 50S dos ribossomos das bactérias, alterando a função da enzima peptil transferase. Sem a ação desta enzima, não há ligação entre os aminoácidos sintetizados e conseqüente inibição da síntese proteica (Sun et al., 2010). Como essas moléculas apresentam função estrutural e enzimática, de vital importância ao funcionamento das células, a inibição da produção de proteínas promove a paralisação do crescimento e posteriormente estagnação e morte da célula bacteriana.

Em dose certa, o FF apresenta ação bacteriostática, porém, quando em altas concentrações, sua ação também é bactericida.

Em tilápias de águas continentais, que receberam FF por via oral na dose de 10 mg/kg de pv em dose única, foi verificada concentração máxima deste fármaco no fígado e nas brânquias duas horas após sua administração. No músculo e no rim, a concentração máxima foi observada após 12 horas. Em 24 horas após a administração do fármaco, verificou-se que essas concentrações já se encontravam muito próximo do LMR permitido, que é de 1 µg/g, com exceção apenas para a bile que apresentou concentração máxima neste período. A concentração encontrada de FF em todos os tecidos acima citados, após 48 hrs da administração do fármaco, estava bem abaixo do LMR (Feng et al., 2008). Verifica-se ainda que em salmão, a absorção de FF ocorre no intestino e sua distribuição apresenta concentrações similares no músculo e no plasma (Horsberg et al., 1994).

Feng et al. (2009), observaram em tilápias, após 12 horas da administração de dose única de FF por via oral (10 mg/kg de pv), concentrações máximas deste fármaco no plasma, músculo, fígado, rim, bile e brânquias dos peixes. Completando 24 hrs de administração da dose, as concentrações de FF no músculo, fígado e brânquia, foram muito próximas do LMR. Para o rim e para a bile, o resíduo de FF permaneceu alto mesmo após 168 horas da administração do fármaco.

O FF apresenta uma elevada lipofilicidade, esta característica desfavorece a eliminação do FF por via renal, por causa da maior afinidade com o epitélio tubular distal. O epitélio tubular tem constituição lipoprotéica, portanto, os fármacos lipossolúveis têm maior facilidade de serem reabsorvidos pelo túbulo voltando à circulação sistêmica. Este fato é visível quando se observa a variação na concentração do FF no rim, a qual aumenta, diminui e volta a aumentar (Feng et al., 2009).

O FF é parcialmente biotransformado em florfenicol amina (FFA), florfenicol ácido oxâmico e florfenicol álcool em pescado após sua administração. A proporção de cada metabólito é diferente em cada espécie, porém o FFA é o metabólito majoritário na maioria das espécies (EMEA, 1997; EMEA, 1999). Portanto, a FFA é definida como um marcador de resíduos, para a presença de FF por muitos países e organizações.

Tambaqui

O *Colossoma macropomum*, vulgarmente conhecido como tambaqui (Figura 3), é o segundo maior peixe de escama da América do Sul (Isaac & Ruffino, 2000). Nativo da Região Norte do Brasil, é uma das espécies aquáticas de maior expressão na alimentação dessa região. Possui grande importância econômica devido ao alto padrão de crescimento, qualidade da carne e rusticidade (Menezes et al., 2008).



Figura 3. Tambaqui (*Colossoma Macropomum*) utilizado nos ensaios experimentais desta tese.

Pertence à subfamília *Serrasalminae*, dentro da família *Characidae* (Jegú, 2003). Sua dieta natural inclui zooplâncton, frutos e sementes, sendo considerado um onívoro com tendência a frugívoro (Dairiki & Silva, 2011). Em ambiente de criação, aceita bem ração, grãos e coprodutos agroindustriais (Araújo-Lima & Gomes, 2005).

A faixa ideal de temperatura é de 26-32 °C e a faixa de pH ideal está entre 6 e 8 (Mendonça et al., 2009). A espécie alcança 3,0 kg em 12 meses de criação em sistemas de viveiros/barragens, com produção de 10.075 kg/ha (Iziel & Melo, 2004), sendo sua criação considerada lucrativa, com rentabilidade que varia de 19 a 40% (Melo et al., 2001).

Sua criação vem se expandindo nas Regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste (IBAMA, 2005) e isso tem sido atribuído ao seu excelente potencial para produção intensiva, principalmente pela fácil obtenção de juvenis, bom potencial de crescimento, alta produtividade, resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido e boa conversão alimentar (Sain-Paul, 1986; Val et al., 1998; Araújo-Lima & Goulding, 1998; Melo et al., 2001; Araújo-Lima & Gomes, 2005).

Doenças bacterianas em tabaqui

Um dos principais problemas relacionados à criação de tabaqui é a ocorrência de doenças parasitárias e bacterianas (Araújo-Lima & Goulding, 1998; Malta et al., 2001).

As bacterioses que comumente acometem a piscicultura são as causadas pelos gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium columnare*, *Streptococcus* spp. Essas doenças são consideradas grandes problemas para a piscicultura por representarem potenciais riscos à produção, com alta mortalidade e perda da lucratividade (Kubitza & Kubitza, 2004; Pilarski et al., 2008).

Conhecida como septicemia hemorrágica, a bacteriose causada pela *Aeromonas hydrophila* acomete frequentemente a criação de peixes de água continental (Peixoto et al., 2012). Esta bactéria é encontrada naturalmente na microbiota normal do intestino de peixes saudáveis e na água dos viveiros, porém em condições de debilidade e baixa imunidade, ela se manifesta causando doença (Jeney & Jeney, 1995).

A bactéria *Flavobacterium columnare*, desde a década 1980, apresenta substancial impacto na piscicultura (Decostere et al., 1998). É considerada um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento da aquicultura mundial visto seu potencial de virulência, particularmente em alevinos, e pelo alto custo do tratamento, que muitas vezes se torna inviável (Sebastião et al., 2010). Também é considerada oportunista e compõe parte da microbiota normal da água, solo, pele, intestino e brânquias dos peixes (Barja & Estevez-Toranzo, 1988). Sob condições desfavoráveis aos peixes, tais como, mudança repentina de temperatura, superior a 20°C, diminuição da taxa de oxigênio dissolvido, elevada concentração de amônia, elevada densidade populacional, contaminação por outras bactérias ou danos causados à superfície corporal dos peixes, a bactéria consegue invadir o hospedeiro desencadeando a doença (Wakabayashi & Egusa, 1972).

As *Pseudomonas fluorescens* são geralmente encontradas no solo, na água e estão intimamente relacionada com estresse ambiental, em especial o aumento da temperatura da água. Os sinais mais característicos são lesões hemorrágicas sobre a pele e a morte rápida dos peixes doentes (Meyer & Collar, 1994).

As infecções por *Streptococcus* em peixes são caracterizadas por quadros de septicemia, meningoencefalite e na forma de abscessos na musculatura dos animais,

Os principais sinais clínicos além dos abscessos são natação errática e em rodopios, perda de escamas, escurecimento do tegumento, anorexia, excitabilidade e morte. A doença atinge um quadro endêmico no plantel e caso o tratamento não seja realizado, ela pode persistir na propriedade através dos sucessivos ciclos de produção (Agnew & Barnes, 2007)

Importância de ensaios farmacocinéticos e de depleção de resíduos

Na medicina veterinária existe uma diversidade enorme de espécies com diferentes tamanhos corporais e com diferentes barreiras de absorção que requerem terapias distintas. Deste modo, a realização de ensaios farmacocinéticos é essencial para a aplicação racional e eficaz de produtos veterinários.

O medicamento veterinário contendo FF, atualmente comercializado, é indicado no tratamento de bacterioses em tilápias e trutas. Para estas espécies, foram realizados ensaios de farmacocinética e de depleção de resíduos, para determinação do período de carência. Porém, cada espécie responde a um medicamento de maneira diferente.

As funções fisiológicas, tais como a taxa de filtração glomerular renal, o consumo de oxigênio, a frequência cardíaca e respiratória e a taxa metabólica basal, são diferentes para cada espécie animal. A farmacocinética de cada espécie também é influenciada pelos hábitos alimentares, que afetam diretamente a eliminação e os tempos de meia-vida das substâncias ativas (Riviere, 1999), assim como suas características anatômicas e de reações bioquímicas (Davidson et al., 1986).

Em estudo realizado com truta arco-íris e pargo (Salvo et al., 2013), tratados com FF via oral, na ração, na concentração de 10 mg/kg de pv, durante 10 dias, sob as mesmas condições de temperatura, foram obtidas diferentes concentrações de FF após o término do tratamento. No primeiro dia, foi encontrado 2,7 µg/g no músculo de truta e 1,6 µg/g no músculo de pargo. O cálculo final de período de carência foi de cinco dias e quatro dias, respectivamente, sendo verificado um declínio mais rápido para o pargo.

Feng et al. (2008) avaliaram a distribuição nos tecidos e a eliminação de FF em tilápias de águas continentais e de águas marinhas, após administração por via oral, e verificaram um maior tempo de eliminação do fármaco nas tilápias de águas continentais, para quase todos os tecidos (músculo, fígado, rim e brânquias), com exceção da bile, que apresentou tempo de eliminação mais longo em tilápias de águas marinhas. Os autores concluíram que o nível de distribuição do FF nos tecidos foi maior nos peixes de águas continentais e a eliminação mais rápida nos peixes de águas marinhas.

A Tabela 2 mostra alguns estudos farmacocinéticos e também de depleção de resíduos realizados em diferentes espécies de peixes. Pode-se observar as diferentes concentrações de FF e FFA atingidas no plasma e nos tecidos, nas diferentes espécies.

Tabela 2. Farmacocinética do florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) em diferentes espécies de peixes.

Animal	Peso (g)	Água	Via de Administração	Dose administrada do fármaco	Período de administração da dose	Farmacocinética				LMR	Referência	
						C _{máx} (µg/mL)	T _{máx} (h)	T _{½ vida} (h)	Período de carência			
Bagre, <i>Ictalurus punctatus</i> (Rafinesque)	900	Cont.	20-28°C	Oral – via ração	9,3 mg/kg pv	12 dias	-	-	-	Músculo – 7 dias (FFA)	1 µg/g	Wrzesinski et al. 2006
Carpa (<i>Carassius auratus cuvieri</i>)	260	Cont.	25 °C	Intramuscular	40 mg/kg pv	única	Plasma-16,82 (FF)	Plasma-1,50 (FF)	Plasma-38,22 (FF)	-	-	Zhao et al. 2010
				Oral			Plasma-29,32 (FF)	Plasma-1,61 (FF)	Plasma-2,17 (FF)	-	-	
Enguia (<i>Monopterus albus</i>)	71	Cont.	25 °C	Intramuscular	20 mg/kg pv	única	Plasma-10,83 (FF)	Plasma-7 (FF)	Plasma-18,39 (FF)	-	-	Xie et al. 2012b
							Plasma-1,85 (FFA)	Plasma-9 (FFA)	Plasma-25,58 (FFA)			
							Músculo-8,30 (FF)	Músculo-11 (FF)	Músculo-25,77 (FF)			
							Músculo-1,82 (FFA)	Músculo-11 (FFA)	Músculo-43,32 (FFA)			
				Oral			Plasma- 8,37 (FF)	Plasma- 5 (FF)	Plasma- 13,46 (FF)			
							Plasma- 2,18 (FFA)	Plasma- 7 (FFA)	Plasma- 13,19 (FFA)			
							Músculo-9,36 (FF)	Músculo-7 (FF)	Músculo-18,48 (FF)			
							Músculo-2,17 (FFA)	Músculo-11 (FFA)	Músculo-28,52 (FFA)			
Bagre (<i>Silurus asotus</i>)	280	Cont.	23 °C	Intravenoso	20 mg/kg pv	única	Plasma- 3,91 (FFA)	Plasma- 0,5 (FFA)	Plasma- 11,12 (FF)	-	-	Park et al. 2006
				Oral			Plasma-9,59 (FF)	Plasma-8,0 (FF)	Plasma-15,69 (FF)			
							Plasma-3,57 (FFA)	Plasma-7,33 (FFA)	Plasma-21,72 (FFA)			

Olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	380	Marin.	19 °C	Intravenosa	5 m/kg pv	única	-	-	Plasma-38,06 (FF)	-	-	Lim et al. 2010
				Oral	20 mg/kg pv	única	Plasma-12,81 (FF)	Plasma-4,00 (FF)	Plasma-51,18 (FF)	-	-	
				Oral	20 mg/kg pv	3 dias	-	-	-	Músculo - 8 dias (FF)	1 µg/g	
Pacu vermelho (<i>Piaractus brachypomus</i>)	400	Cont.	25 °C	Intramuscular	10 mg/kg pv	única	Plasma-1,09 (FF)	-	Plasma-4,25 (FF)	-	-	Lewbart et al. 2005
Truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	220	Cont.	14 °C	Oral – via ração	10 mg/kg pv	10 dias			-	Músculo e pele - 5 dias (FFA)	1 µg/g	Salvo et al. 2013
Pargo (<i>Pagrus pagrus</i>)	150	Marin.	27 °C							Músculo e pele – 4 dias (FFA)		
Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	115	Cont.	28 °C	Oral – via ração	10 mg/kg pv	única	Músculo-4,29 (FF)	Músculo-12 (FF)	Músculo-8,03 (FF)	-	-	Feng et al. 2008
Tilápia (<i>O. caureus</i>)		Marin.					Músculo-3,60 (FF)	Músculo-12 (FF)	Músculo-6,73 (FF)			
Tilápia-do-Nilo (<i>O. niloticus x O. aureus</i>)	98	Cont.	22 °C	Oral	10 mg/kg pv	única	Plasma-4,46 (FF)	Plasma-12 (FF)	Plasma-10,03 (FF)	-	-	Feng et al. 2009
							Músculo-6,88 (FF)	Músculo-12 (FF)	Músculo-10,97 (FF)			
Tilápia (<i>O. niloticus</i>)	507	Cont.	27 °C	Oral – via ração	10 mg/kg pv	10 dias	-	-	-	Músculo e pele – 7 dias (FF)	1 µg/g	Gaikowski et al. 2010

Legenda: pv- peso vivo; C_{máx}- concentração máxima; T_{máx} - tempo máximo; T_{½ vida} – tempo de meia vida; LMR – limite máximo de resíduo; Cont. – continental; Marin. - marinha.

Assim, para extrapolação de uso de um medicamento veterinário, é fundamental a realização de ensaios farmacocinéticos com as diferentes espécies para as quais o fármaco será destinado. Desta forma, direciona-se de maneira segura e eficaz o tratamento da enfermidade em virtude das particularidades farmacocinéticas de cada espécie animal.

Determinação de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) em pescado

Na determinação analítica, é necessário conhecer as características físicas, químicas e fisico-químicas das moléculas de interesse, para aplicar o melhor solvente de extração, realizar a limpeza do extrato (*clean-up*), escolher o melhor método de detecção e, assim, obter resultados satisfatórios nas análises.

O FF apresenta massa molecular de 358,21 g/mol, é comercializado na forma de pó. Sua fórmula molecular é $C_{12}H_{14}Cl_2FN_4S$ e a sua fórmula química é ([R-(R,S)]-2,2-dicloroN-[-(fluorometilo)-(-hidroxi)-(-[4-(sulfometil)fenil]etil]-acetamida (Schering-Plough, 2007). O seu ponto de fusão situa-se entre 153-154 °C e apresenta elevada solubilidade em solventes orgânicos de baixa e média polaridade como acetona, acetonitrila, metanol e acetato de etila. Esta molécula não se ioniza em um intervalo de pH de 3 a 9 e é fracamente solúvel em soluções aquosas, visto seu alto valor de pKa, 9,03 (Sams, 1994; Wang et al., 2014). Apresenta alto coeficiente de solubilidade octanol/água (2,36), o que facilita a sua distribuição nos tecidos. É estável à luz, calor e umidade e é não higroscópico (Schering-Plough, 2007). Como resultado de sua biotransformação nos organismos animais, o FF apresenta um metabólito de elevada importância na aquicultura, o FFA. Este apresenta massa molecular de 247,29 g/mol, e também é comercializado na forma de pó. Sua fórmula molecular é $C_{10}H_{14}FNO_3S$ e a sua fórmula química é (α R) - α -[(1S) -1-Amino-2-fluoroetil]-4-(metilsulfonil) benzeno metanol, D- (-) -2-Amino-3-fluor-1-[4- (i) fenil]-1-propanol. Apresenta baixa solubilidade em solventes orgânicos, porém, em meio aquoso, esta solubilidade é melhorada.

Os métodos de extração relatados na literatura baseiam-se no emprego de uma solução extratora utilizando solventes orgânicos com solução tampão, limpeza do extrato com cartuchos de extração em fase sólida (SPE) ou ainda com hexano, e concentração da amostra para a determinação quantitativa. Alguns métodos de determinação de FF e FFA em pescado são relatados na Tabela 3.

Tabela 3. Métodos de Extração FF e FFA em pescado.

Espécie	Tecido analisado	Extração	Clean-up	Coluna Analítica	Instrumento	Bibliografia
Channel catfish; <i>Ictalurus punctatus</i> (<i>Rafinesque</i>)	Músculo	Ácido hidrocloreídrico	Varian Chem Elut CE1020 – Cartucho de SPE	Nucleosil - C18	HPLC - UV	Wrzesinski et al. 2006
Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>); Tilápia (<i>O. aureus</i>)	Músculo; Fígado; Rim; brânquias; Bile	Acetato de etila	Hexano	Nucleodur - C18	HPLC - UV	Feng et al. 2008
Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>) Tilápia (<i>O. aureus</i>)	Músculo com pele	Ácido hidrocloreídrico	Varian Chem Elut CE120 – Cartucho de SPE	C18	HPLC - UV	Gaikowski et al. 2010
Enguia (<i>Monopterus albus</i>)	Plasma; Rim; Músculo; Fígado	Acetona e tampão fosfato 0,1M (pH 7,0); Diclorometano e hidróxido de amônio	Hexano	XDB-C18	HPLC - UV	Xie et al. 2012b
Truta arco-íris; <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum); Sea bream; <i>Sparus aurata</i> L.	Músculo com pele	Ácido hidrocloreídrico	Varian ChemElut CE 1020- Cartucho de SPE	Zorbax RX - C8	HPLC - UV	Salvo et al. 2013
Truta arco-íris	Músculo	Acetona; Metanol; tampão fosfato de sódio dibásico (pH 3,0)	Varian Bond-Elut LRC – Cartucho de SPE	Merck - C18	HPLC - FLU	Ansari et al. 2012
Olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Plasma; Músculo; Fígado; brânquias	Acetato de etila e Tampão fosfato (pH 7,0)	Hexano	Eclips Plus - C18	HPLC – MS/MS	Lim et al. 2010

Legenda: SPE – extração em fase sólida; C18 – octadecil; HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência; UV – ultravioleta; FLU – Fluorescência; MS/MS - Espectrometria de massas sequencial.

Dentre os métodos analíticos relatados na literatura, verifica-se que a determinação do FF, na grande maioria dos trabalhos, encontra-se inserida em um método multiresíduo, em que se determinam compostos da família dos anfenicóis. Verifica-se ainda que a determinação multiresíduo raramente inclui o seu metabólito em pescado, a FFA. Quando a determinação deste está inserida na metodologia, analisam-se somente o FF, ou ainda, em alguns artigos submete-se o FF à hidrólise ácida e quantifica-se o seu metabólito, a FFA (Kosoff et al., 2009; Gaikowski et al., 2012; Wrzesinski et al., 2003). Estas metodologias atendem à legislação, visto que o LMR é estabelecido para a somatória dos níveis de resíduo do fármaco e seus metabólitos.

O LMR permitido do FF somado ao seu metabólito para pescado é de 1 µg/g. Quando comparado ao LMR de outras classes de antimicrobianos, como por exemplo as quinolonas e as sulfonamidas, apresenta-se como uma vantagem no desenvolvimento da metodologia, por permitir maior quantidade do analito. Assim, métodos com menor detectabilidade podem ser aplicados na determinação de resíduos de FF em pescado.

Os métodos mais utilizados, na determinação de resíduos de FF e FFA em matrizes alimentícias, empregam a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) associada a detectores de ultravioleta (Wrzesinski et al., 2006; Feng et al., 2008; Gaikowski et al., 2010; Xie et al., 2012b), arranjo de diodos (Anadón et al., 2008; Jiancheng et al., 2006) e fluorescência (Pouliquen et al., 2005; Kaizhou et al., 2011; Xie et al., 2012a). Em menor quantidade, encontram-se trabalhos com HPLC associado à espectrometria de massas (LC-MS) (Lim et al., 2010; Pengjie et al., 2010; Zhang et al., 2008).

Encontram-se também métodos que utilizam cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Liu et al., 2010), eletroforese capilar (Kowalski et al., 2005), e também por imunoafinidade (Luo et al., 2009; Wu et al., 2008).

Para realização da cromatografia na determinação do FF e da FFA, são utilizadas coluna de fase reversa de Octadecil Silano, C18 (Wrzesinski et al., 2006; Feng et al., 2008; Gaikowski et al., 2010; Xie et al., 2012b; Ansari et al., 2012; Lim et al., 2010). As fases móveis utilizadas são geralmente constituídas por misturas de acetonitrila ou metanol, e soluções aquosas acidificadas ou tamponadas. O pH da fase móvel é ajustado levando-se em consideração o pka dos compostos, e verifica-se que para detectores de massas, para auxiliar a ionização das moléculas, utiliza-se pH de 3 a 4,5 (Lim et al., 2010; Gaunt et al., 2012). Devido à diferença de polaridade entre o FF e a FFA, o gradiente da fase móvel é ajustado em função da cromatografia de separação em menor tempo possível.

Considerações finais

A aquicultura é um sistema de produção de alimentos que apresenta um potencial enorme a ser explorado mundialmente, com destaque para o potencial do Brasil e de uma espécie nativa da região amazônica, o tambaqui. O uso de medicamentos veterinários é um importante instrumento para garantir a alta produtividade em sistemas intensivos, e o FF é um fármaco que apresenta características vantajosas no tratamento das principais doenças que acometem a piscicultura. A farmacocinética e a depleção de resíduos do FF são diferentes em cada espécie, apresentando diferentes concentrações no plasma e nos tecidos, o que remete à importância da realização de estudos nesta área para eficaz aplicação do medicamento e à garantia da segurança dos alimentos. O desenvolvimento de métodos analíticos adequados para a determinação de fármacos nos tecidos e fluidos biológicos é uma ferramenta essencial para o desenvolvimento desse tipo de estudo e requer o conhecimento da molécula de interesse, para o desenvolvimento de métodos confiáveis. A determinação de FF e FFA em pescado tem sido realizada principalmente, por HPLC acoplada a técnicas de absorvância no ultravioleta e pela capacidade de fluorescer destes compostos.

Referências Bibliográficas

- Agnew, W.; Barnes, A.C. Streptococcus iniae: an aquatic pathogen o global veterinary significance and challenging candidate for reliable vaccination. **Journal of Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 1, p. 1-15, 2007.
- Anadón, A.; Martínez, M.A.; Martínez, M.; Ríos, A.; Caballero, V.; Ares I.; Martínez-Larrañaga, M.R. Plasma and Tissue Depletion of Florfenicol and Florfenicol-amine in Chickens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11049-11056, 2008.
- Ansari, M.; Raissy, M.; Rahimi, E. Determination of florfenicol residue in rainbow trout muscles by HPLC in Chaharmahal va Bakhtiari Province, Iran. **Comparative Clinical Pathology**, v. 23, p. 61-62, 2012.
- Araújo-Lima, C.A.; Goulding, M. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Sociedade Civil Mamirauá. Brasília-CNPq, Tefé, Amazonas. 186p, 1998.
- Araújo-Lima, C.A.R.M.; Gomes, L.C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil. Santa Maria, UFSM, 470p, 2005.
- Barja, J.; Estevez-Toranzo, A. Enfermedades bacterianas de peces. In: ESPINOSA J. & UBARTA U. (Ed.). **Patología en Acuicultura**. Madrid, Espanha: Editora Mundi Prensa, p. 475-550, 1988.
- Bertol, T.M.; Ludke, J.V.; Bellaver, C. Efeito do Peso do Suíno em Terminação ao Início da Restrição Alimentar sobre o Desempenho e a Qualidade da Carcaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 417-424, 2001.
- Bowker, J.D.; Ostland, V.E.; Carty, D.; Bowman, M.P. Effectiveness of Aquaflor (50% Florfenicol) to Control Mortality Associated with Streptococcus iniae in Freshwater-Reared Subadult Sunshine Bass. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 22, p. 254-265, 2010.
- Brasil, 2011a. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/politica-agricola/noticias/2012/06/brasil-deve-ampliar-oferta-de-graos-e-manter-reservas-naturais> >. Acessado em 16.04.2015.
- Brasil, 2011b. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Disponível em < http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2011_bol__bra.pdf >. Acessado em 16.04.2015.
- Chang, S.K.; Davis, J.L.; Cheng, C.N.; Shien, R.H.; Hsieh, M.K.; Koh, B.W.; Chou, C.C. Pharmacokinetics and tissue depletion of florfenicol in Leghorn and Taiwan Native chickens. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**, v. 33, p. 471–479, 2010.

- Dairiki, J.K.; Silva, T.B.A. Revisão de literatura: exigências nutricionais do tabaco – compilação de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros. Manaus. EMBRAPA Amazônia Ocidental, Documento 91, 44 p, 2011.
- Davidson, I.W.F.; Parker, J.C.; Beliles, R.P. Biological basis for extrapolation across mammalian species. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 6, n. 3, p. 211-237, 1986.
- Decostere, A.; Haesebrouck, F.; Devriese, L. A. Characterization of four *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) strains isolated from tropical fish. **Veterinary Microbiology**, v. 62, p. 35-45, 1998.
- EMEA, 1997. European Medicines Agency. Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. **Florfenicol (extension to fish), Summary Report, EMEA/MRL/ 251/97-FINAL, 1997.**
- EMEA, 1999. European Medicines Agency. Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. **Florfenicol (extension to chicken), Summary Report, EMEA/ MRL/589/99-FINAL, 1999.**
- FAO, 2011. Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponível em <<http://www.fao.org/figis/servlet/TabSelector> >. Acessado em 24.01.2013.
- FAO, 2014a. Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponível em <<http://www.fao.org/3/d1eaa9a1-5a71-4e42-86c0-f2111f07de16/i3720e.pdf>>. Acessado em 03.04.2014.
- FAO, 2014ab. Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponível em <<http://www.fao.org/3/a-i4136e.pdf> >. Acessado em 04.04.2014.
- Feng, J.B.; Jia, X.P.; Li, L.D. Tissue distribution and elimination of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. caureus*) after a single oral administration in freshwater and seawater at 28 °C. **Aquaculture**, v. 276, p. 29-35, 2008.
- Feng, J.B.; Jia X.P. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) held in freshwater at 22 °C. **Aquaculture**, v. 289, p. 129-133, 2009.
- Gaikowski, M.P; Mushtaq, M.; Cassidy, P.; Meinertz, J.R; Schleis, S.M.; Sweeney, D.; Endris, R.G. Depletion of Florfenicol amine, marker residue Florfenicol, from the edible fillet of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. niloticus* and *O. niloticus* × *O. aureus*) following Florfenicol administration feed. **Aquaculture**, v. 301, p. 1-6, 2010.
- Gaikowski, M.P, 2012. Florfenicol depletion in water, amine from fillet tissue after feeding aquaflor to tilapia. Merck, Animal Health. Disponível em

- <<http://www.thefishsite.com/articles/1491/florfenicol-depletion-in-water-amine-from-fillet-tissue-after-feeding-aquaflor-to-tilapia/>>. Acessado em 16.04.2015.
- Gaunt, P.; Endris, R.G.; Baumgartner, W.; McGinnis, A.; Camus, A.; Steadman, J.; Sun, F.; Sweeney, D. Determination of florfenicol dose rate in feed for control of mortality in Nile tilapia infected with *Streptococcus iniae*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 22, p. 158–166, 2010.
- Gaunt, P.S.; Langston C.; Wrzesinski C.; Gao D.; Adams P.; Crouch L; Sweeney D.; Endris R. Single intravenous and oral dose pharmacokinetics of florfenicol in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of Veterinary Pharmacology and therapeutics**, v. 35, p. 503–507, 2011.
- Gaunt, P.S.; Langston C.; Wrzesinski C.; Gao D.; Adams P.; Crouch L; Sweeney D.; Endris R. Multidose pharmacokinetics of orally administered florfenicol in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of Veterinary Pharmacology and therapeutics**, v. 36, n. 5, p. 502-506, 2012.
- Graham, R.; Palmer, D.; Pratt, B.C.; Hart, C.A. In vitro activity of florfenicol. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 7, p. 691–694, 1988.
- Horsberg, T.E.; Martinsen, B.; Vannab, K.J. The disposition of ¹⁴C-florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 122, p. 97-106, 1994.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da Pesca 2004 Brasil: Grandes Regiões e Unidades da Federação**. Brasília: IBAMA, 98p, 2005.
- INED, 2013. Instituto Francês de Estudos Demográficos. Disponível em <http://www.ined.fr/fr/ressources_documentation/publications/pop_soc/bdd/publication/1555/>. Acessado em 17.1.2013.
- Isaac, V.J.; Ruffino, M.L. Informe estatístico do desembarque pesqueiro na cidade de Santarém, PA: 1992 - 1993. Recursos pesqueiros do Médio Amazonas: biologia e estatística pesqueira. **IBAMA/GTZ/GOPA**, Brasília, p. 225-280, 2000.
- Izel, A.C.U.; Melo, L.A.S. Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em tanques escavados no Estado do Amazonas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 20p, 2004.
- Jegú, M. Subfamily Serrasalminae (Pacu and Piranhas). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. **EDIPUCRS**, p. 182-196, 2003.
- Jeney, Z.S.; Jeney, G. Recent achievements in studies on diseases of common carp (*Cyprinus carpio L.*). **Aquaculture**, v. 129, p. 397-420, 1995.

- Jiancheng, L.; Shuangyang, D.; Suxia, Z.; Cun, L.; Xiaowei, L.; Zhongwei, L.; Jianzhong, S. Residue Depletion of Florfenicol and its metabolite florfenicol amine in swine tissues after intramuscular administration. **Journal of Food Chemistry**, v. 54, p. 9614-9619, 2006.
- Kaizhou, X.; Longfei, J.; Yilin, Y.; Dong, X.; Shuqing, C.; Xing, X.; Yan, P.; Wenbin, B.; Guojun, D.; Jinyu, W.; Zongping, L. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in eggs by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 2351–2354, 2011.
- Kosoff, R.E.; Chen, C.Y.; Wooster, G.A.; Getchell R.G.; Bowser, P.R.; Clifford, A.; Craig, J.L.; Lim, P.; Wetzlich, S.E.; Craigmill, A.L.; Tell, A. Florfenicol Residues in Three Species of Fish after 10-Day Oral Dosing in Feed. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 21, n. 1, p. 8-13, 2009.
- Kowalski, P.; Konieczna, L.; Chmielewska, A.; Oledzka, I.; Plenis, A.; Bieniecki, M.; Lamparczyk, H. Comparative evaluation between capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the analysis of florfenicol in plasma. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 39, n. 5, p. 983-989, 2005.
- Kubtiza, F.; Kubtiza, L.M.M. Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados. Jundiaí, 4ª Edição, p.118, 2004.
- Lewbart, G.A.; Papich, M.G.; Whitt-Smith, D. Pharmacokinetics of florfenicol in the red pacu (*Piaractus brachypomus*) after single dose intramuscular administration. **Journal of veterinary Pharmacology Therapeutics** v. 28, p. 317–319, 2005.
- Lim, J.H.; Kim, M.S.; Hwang, Y.H.; Song, I.B.; Park, B.K.; Yun, H.I. Plasma and tissue depletion of florfenicol in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration. **Aquaculture**, v. 307, p. 71-74, 2010.
- Liu, W.L.; Lee, R.J.; Lee, M.R. Supercritical fluid extraction *in situ* derivatization for simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol in shrimp. **Food Chemistry**, v. 121, p. 797–802, 2010.
- Luo, P.; Jiang, H.; Wang, Z. Simultaneous Determination of Florfenicol and Its Metabolite Florfenicol Amine in Swine Muscle Tissue by a Heterologous Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Veterinary Drug Residues. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 3, 2009.
- Malta, J.C.O.; Gomes, A.L.S.; Andrade, S.M.S. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, (*Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae*) em

- tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia central. **Acta Amazonica**, v. 31, p.133-143, 2001.
- Martinsen, B.; Horsberg, T.E.; Varmab, K.J.; Sam, R. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater at 11°C. **Aquaculture**, v. 112, p. 1-11, 1993.
- Melo, L.A.S.; Izel, A.C.U.; Rodrigues, F.M. Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em viveiros de argila/barragens no Estado do Amazonas. Manaus: Embrapa-CPAA, 30p, 2001.
- Mendonça, P.P.; Ferreira, R.A.; Vidal Junior, M.V.; Andrade, D.R.; Santos, MVB; Ferreira, A.V.; Rezende, F.P. Influência do fotoperíodo no desenvolvimento de juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum*. **Arquivos de Zootecnia**, v. 58,n. 223, 2009.
- Menezes, J.T.B.; Queiroz, L.J.; Costa, D.C.R.; Menezes, J.R.J.B. Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Acta Amazonica**, v. 38, p. 365-368, 2008.
- Meyer, F.P.; Collar, J.D. Discription and treatament of Pseudomonas infection in white catfish. **Journal of Applied Microbiology**, v. 12, p. 201-203, 1994.
- MSD, 2015.MSD - Animal Health. Disponível em <http://www.msds-aude-animal.com.br/products/aquaflor__50__premix_/010_caracteristicas.aspx>. Acessado em 07.06.2015.
- Oliveira, M.M.O.; Pimenta, M.E.S.G.; Pimenta, C.J.; Camargo, A.C.S.; Fiorini, J.E.; Logato, P.V.R. Digestibilidade e desempenho de alevinos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de silagem ácida de pescado. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1196-1204, 2006.
- Park, B.K.; Lim, J.H.; Kim, M.S.; Yun, H.I. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in the Korean catfish (*Silurus asotus*). **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**, v. 29, p. 37-40, 2006.
- Peixoto, L.J.S.; Sá, M.C.A.; Gordiano, L.A.; Costa, M.M. *Aeromonas spp.*: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.3, p.453-461, 2012.
- Pengjie, L.; Xia, C.; Chunlai, L.; Hua, K.; Liming, L.; Zhigang, J.; Zhanhui, W.; Cun, L.; Suxia, Z.; Jianzhong, S. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in swine muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with immunoaffinity chromatography clean-up. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 207-212, 2010.

- Perotto, D.; Moletta, J.L.; Oliveira, J.E.P.; Lesskiu, C. Consumo e Conversão Alimentar de Machos Bovinos Inteiros Charolês, Caracu e Cruzamentos Recíprocos em Confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 108-116, 2000.
- Pilarski, F.; Rossini, A.J.; Ceccarelli, P.S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* from four tropical fish species in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 68, n. 2, p. 409-414, 2008.
- Pouliquen, H.; Morvan, M.L. Determination of Florfenicol in Freshwater, Sediments and Bryophyte *Fontinalis antipyretica* by HPLC with Fluorescence Detection. **Chromatographia**, v. 62, n. 5-6, 2005.
- Riviere, J.E. Comparative Pharmacokinetics: Principles Techniques and Applications. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 1999.
- Rocha, P.T.; Stringhini, J.H.; Andrade, M.A.; Leandro, N.S.M.; Andrade, M.L.; Café, M.B. Desempenho de Frangos de Corte Alimentados com Rações Pré-iniciais Contendo Diferentes Níveis de Proteína Bruta e Energia Metabolizável. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p.162-170, 2003.
- Saint-Paul, U. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. **Aquaculture**, v. 54, p. 205-240, 1986.
- Salvo, A.D.; Della Rocca, G.; Terzetti, E.; Malvisi J. Florfenicol depletion in edible tissue of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and sea bream, *Sparus aurata* L. **Journal of Fish Diseases**, 2013.
- Sams, RA. Florfenicol: chemistry and metabolism of a novel broad-spectrum antibiotic. In: Proceedings of the XVIII World Buiatrics Congress. Bologna, Italy, p. 13-7, 1994.
- Schering-Plough, 2007. Nuflor®, an antibiotic Type A medicated article for swine. Technical Monograph. Schering-Plough Animal Health. Disponível em <http://www.merck-animal-health-usa.com/binaries/nuflor1_tcm96-86242.pdf>. Acessado em 16.04.2015.
- Schmid, A. Chloramphenicol ruckstaende in Lebensmittel tierischer Herkunft alls potentielle Ursache der aplastischen Anaemie der Menschen. **Otsch Tieraerztl Wochenschr**, v. 90, p. 201-248, 1983.
- Sebastião, F.A.; Pilarski, F.; Lemos, M.V.F. Isolation and molecular characterization of *Flavobacterium columnare* strains from fish in Brazil. **Journal of Bacteriology Research**, v. 2, p. 22-29, 2010.
- SEBRAE, 2008. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Disponível em <http://www.gipescado.com.br/arquivos/sebrae_tilapia.pdf>. Acessado em 22.01.2013.

- Silva, C.M.A. 2001. Bactérias gram-negativas isoladas do tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) criado em cativeiro, Amazonas-Brasil. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 66 pp.
- Sun, Y.X.; Zhao, H.Y.; Shan, Q.; Zhu, S.; Zeng, D.P.; Liu, Z.C. Tissue distribution and elimination of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus cuvieri*) after a single dose intramuscular or oral administration. **Aquaculture**, v. 309, p. 82–85, 2010.
- UNICEF, 2014. United Nations Children's Fund. Disponível em <http://www.unicef.org/rightsite/sowc/pdfs/statistics/SOWC_Spec_Ed_CRC_TABLE%201.%20BASIC%20INDICATORS_EN_111309.pdf>. Acessado em 19.05.2014.
- Val, A.L.; Silva, M.N.P.; Almeida-Val, V.M.F. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. **South African Journal of Zoology**, v. 33, p. 107-114, 1998.
- Wakabayashi, H.; Egusa, S. Preliminary experiments on environmental factors influencing the prevalence of columnaris disease. **Fish Pathology**, v. 7, p. 58-63, 1972.
- Wang, J.; Macneil, J.D.; Kay, J.F. Chemical analysis of antibiotic residues in food. Canada: John Wiley & Sons, 2012, 366p. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9781118067208>>. Acessado em 28.03.2014.
- Wrzesinski, C.L.; Crouch, L.S. Drugs, Cosmetics, Forensic Sciences. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 3, 2003.
- Wrzesinski, C.; Crouch, L.; Gaunt, P.; Holifield, D.; Bertrand, N.; Endris, R. Florfenicol residue depletion in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Aquaculture**, v. 253, p. 309-316, 2006.
- Wu, J.; Chang, C.; Ding, W.; He, D. Determination of florfenicol amine residues in animal edible tissues by an indirect competitive ELISA. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8261-8267, 2008.
- Xie, K.; Jia, L.; Yao, Y.; Xua, D.; Chena, S.; Xie, X.; Peia, Y.; Baoa, W.; Daia, G.; Wang, J.; Liud, Z. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in eggs by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 2351-2354, 2011.
- Xie, K.; Guo, H.; Jia, L.; Huang, Y.; Xie, X.; Yao, Y.; Xu, D.; Chen, X.; Dai, G.; Zhang, X.; Sun, Y.; Wang, J.; Liu, Z. Residue Depletion of Florfenicol and its metabolite Florfenicol amine in eggs. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, p. 1012-1017, 2012a.

- Xie, L.L.; Wu, Z.X.; Chen, X.X.; Li, Q.; Yuan, J.; Liu, H.; Yang, Y. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in rice field eel (*Monopterus albus*) after a single-dose intramuscular or oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 2012b.
- Zhang, S.; Liu, Z.; Guo, X.; Cheng, L.; Wang, Z.; Shen, J. Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 875, p. 399–404, 2008.
- Zhao, H.Y.; Zhang, G.H.; Bai, L.; Zhu, S.; Shan, Q.; Zeng, D.P.; Sun Y.X. Pharmacokinetics of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus cuvieri*) after a single intramuscular or oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, p. 460-463, 2010.

CAPÍTULO II

Florfenicol e florfenicol amina em plasma de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Luciana da Conceição Castello Branco; Fabiana Pilarski; Edsandra Campos Chagas; Vera Lúcia Ferracini; Felix Guillermo Reyes Reyes

Este capítulo será submetido para publicação no Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics

Florfenicol e florfenicol amina no plasma de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

RESUMO

Em vista do imenso potencial para o desenvolvimento da piscicultura no Brasil, são de elevada importância estudos para o efetivo e correto tratamento de enfermidades que acometem os peixes em sistemas intensivos de produção. As pesquisas nesta área ganham destaque pelos benefícios trazidos não só para o produtor e consumidor, mas também pelo aspecto econômico beneficiando o mercado exportador dessa *commodity* alimentar. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a farmacocinética do florfenicol (FF) no tambaqui, visto que ainda não existem estudos deste fármaco com esta espécie nativa da região amazônica. Para tanto, foi administrado FF via ração, em dose única de 21,0 mg/kg de peso vivo, e o plasma coletado após 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 12; 24; 48; 96; 168; 216 e 264 horas após a administração da ração medicada. Foram desenvolvidos e validados métodos analíticos para quantificação de FF na ração e de FF e florfenicol amina (FFA) em plasma, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. Os métodos analíticos foram validados com base nas recomendações descritas nos guias utilizados como referência, e apresentaram exatidão, precisão e linearidade adequadas, com baixos limites de quantificação (LOD) e detecção para o plasma, nos analitos estudados (FF e FFA). Os parâmetros farmacocinéticos verificados para o plasma foram: concentração máxima de 2,43 e 1,55 µg/mL para FF e FFA, respectivamente, no tempo máximo de 12 horas e Tempo de Meia Vida de 32,43 e 21,4 horas, respectivamente. Estes resultados indicam que o FF na concentração administrada apresenta potencial para tratamento de bacterioses em tambaqui.

Palavras-chave: Florfenicol, florfenicol amina, farmacocinética, *Colossoma macropomum*, plasma, HPLC-FLD.

Florfenicol and florfenicol amine in the plasma of tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Abstract

In view of the immense potential for the development of fish farm in Brazil, studies for the effective and correct treatment of disease that attack fish in intensive production systems are of high importance. The research in this area is highlighted by the benefits brought to not only the producer and consumer, but also by the economic aspect, benefitting the exporting market of this food commodity. Therefore, the objective of this paper was to evaluate the pharmacokinetic of the florfenicol (FF) in tambaqui, because that there are no studies of this drug with this native species of the Amazon region so far. Therefore, FF was administered in the feed, in a single dose of 21.0 mg/kg of live weight, and plasma was collected after 0.5; 1.0; 2.0; 4.0; 8.0; 12; 24; 48; 96; 168; 216 and 264 hours after the administration of the medicated feed. Analytical methods were developed and validated for the quantification of FF in the feed and of FF and florfenicol amine (FFA) in the plasma, using high performance liquid chromatography with a fluorescence detector. The analytical methods were validated based on the recommendations described in the guides reference used, and they showed adequate accuracy, precision, and linearity, with low quantification (LOQ) and detection (LOD) in the plasma, limits for the analytes studied (FF and FFA). The pharmacokinetic parameters verified for the plasma were maximum concentration (C_{max}) of 2.43 and 1.55 µg/mL for FF and FFA, respectively, in the maximum time (T_{max}) of 12 hours and time of half life (t_{1/2}) of 32.43 and 21.4 hours, respectively. These results indicated that the FF in the concentration administered shows potential for the treatment of bacterial infections in tambaqui.

Key words: Florfenicol, Florfenicol amine, Pharmacokinetics, *Colossoma macropomum*, Plasma, HPLC-FLD.

Introdução

A aquicultura é o sistema de produção com maior potencial de crescimento no mundo. O Brasil é um país que apresenta capacidade elevada para ampliação de sua produção aquícola, pois detém cerca de 12% da água continental disponível no planeta, extenso litoral e ampla faixa marítima a ser explorada neste tipo de criação (Brasil, 2013).

A piscicultura representa aproximadamente 50% da produção aquícola mundial, sendo a carpa e a tilápia as espécies de águas continentais mais produzidas. No Brasil, a tilápia e a carpa também são as espécies mais produzidas, contudo, também merecem destaque a produção do tambaqui, tambacu e pacu, que juntas representam 24,6% da produção por aquicultura continental (Brasil, 2011).

O tambaqui, pacu e alguns híbridos, são os peixes redondos de maior importância para a piscicultura comercial no Brasil (Brasil, 2011). A maior parte da produção destas espécies ainda é proveniente da pesca extrativa, sendo o tambaqui uma das espécies mais capturadas na região do Baixo Amazonas. Esta espécie, assim como tantas outras está sofrendo uma intensa exploração que poderá implicar na diminuição de seus estoques naturais.

De encontro a este cenário, o sistema intensivo de produção do tambaqui tem crescido e até o presente momento, é a principal espécie nativa produzida no Brasil. Sua produção cresceu 139,1% no período de 2009 a 2011 (Brasil, 2011).

As práticas agrícolas em sistemas de criação intensiva, caracterizado pelas altas densidades populacionais e má qualidade da água, pode propiciar problemas nutricionais e de enfermidades infecciosas e parasitárias, de grande preocupação na piscicultura. A facilidade de transmissão de doenças e a proximidade dos animais em sistemas intensivos e semi-intensivos facilitam a disseminação dessas doenças as quais se apresentam como um dos principais obstáculos sanitários e produtivos (Malta et al., 2001; Silva, 2001). Sendo assim, a utilização de antimicrobianos se faz necessária para o tratamento dessas doenças.

No Brasil existem unicamente dois antimicrobianos aprovados para uso na aquicultura: florfenicol e oxitetraciclina. O FF é um antimicrobiano sintético de amplo espectro desenvolvido especialmente para uso veterinário (Figura 1). É derivado do tianfenicol e contém um átomo de flúor no carbono três ao invés do grupo hidroxila (Graham et al., 1988). Esta substituição promoveu maior espectro de ação antibacteriana, ausência de inconvenientes de resistência bacteriana e não causa anemia aplásica nos animais, como o cloranfenicol. Seu principal metabólito é a florfenicol amina (FFA) (Figura 1).

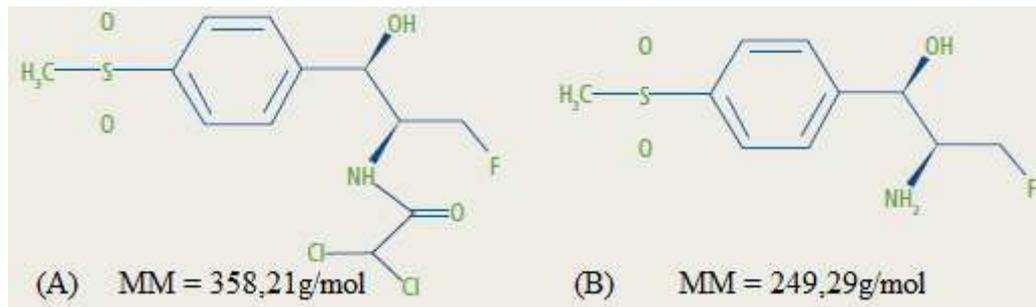


Figura 1. Estrutura química do florfenicol (A) e do seu metabólito principal, a florfenicol amina (B).

Fonte: Gaikowski et al. (2013).

Na aquicultura, o FF é indicado para o tratamento da septicemia hemorrágica bacteriana, causada pela *Aeromonas hydrophila*, da estreptococose, causada pela bactéria *Streptococcus agalactiae* e da columnariose, causada pela *Flavobacterium columnare* em várias espécies de tilápia e seus híbridos, sendo também indicado para o tratamento da doença da boca vermelha, causada pela bactéria *Yersinia ruckerii* em truta arco-íris (Bowker et al., 2010). A administração deste fármaco se faz via ração com solubilização em óleo visto sua baixa solubilidade em água.

Frequentemente, observa-se nas diversas espécies animais que um mesmo medicamento, administrado na mesma forma farmacêutica, resulta em diferenças nos processos farmacocinéticos (absorção, distribuição, biotransformação e eliminação) e na sensibilidade farmacodinâmica dos sítios de ação tecidual entre as espécies. Mesmo dentro de uma mesma espécie, quando adaptados a condições diferentes notam-se variações.

Alguns artigos citam diferentes parâmetros farmacocinéticos; concentração máxima ($C_{m\acute{a}x}$), tempo para atingir a concentração máxima ($T_{m\acute{a}x}$) e tempo de meia vida ($T_{1/2}$), em diferentes espécies, apesar de serem submetidos à mesma dose e via de exposição de FF. Verifica-se que a concentração máxima é atingida entre 5 e 8 horas após a administração do fármaco para peixes de águas continentais (Xie et al., 2012b; Park et al., 2006) e em 4 horas para peixes de águas marinhas (Lim et al., 2010). Deve-se levar em conta, ainda, que a diferença entre as espécies e o tamanho do peixe utilizado no ensaio influenciam na absorção.

Assim, é fundamental a realização de estudos de farmacocinética para todas as espécies as quais o fármaco veterinário se destina, para se conhecer a velocidade de absorção, a concentração máxima atingida, bem como o tempo que o fármaco estará presente no animal para efetivamente atuar no tratamento da bacteriose envolvida, haja vista as diferenças metabólicas de cada espécie.

Com foco nas boas práticas veterinárias, esses estudos auxiliam na determinação correta e eficaz do tratamento da enfermidade evitando, assim, subdosagens, superdosagens e conseqüentemente minimizando o desenvolvimento de resistência bacteriana. Para tanto, métodos cromatográficos são amplamente utilizados, haja vista os baixos limites de detecção e quantificação necessários para acompanhar com maior eficiência a concentração de fármacos nos fluidos e tecidos analisados.

Na literatura são relatados diversos métodos analíticos para determinação de FF em plasma de peixes empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), associada a detectores de ultravioleta (UV) (Xie et al., 2012b). Todavia, para a detecção e quantificação de resíduos de fármacos em matrizes biológicas, são preferencialmente empregadas técnicas seletivas, como fluorescência (FLU) e espectrometria de massas (MS e MS/MS) (Lim et al., 2010; Park et al., 2006), por possuírem características de alta seletividade e detectabilidade.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo o estudo farmacocinético do FF em tambaqui, avaliando o tempo de absorção e decaimento deste fármaco e de seu metabólito FFA, no plasma, após administração via oral (pela ração) em dose única. Para tanto, foi desenvolvida e validada metodologia analítica (HPLC-FLU), para quantificação dos analitos mencionados.

Material e Métodos

Solventes e Reagentes

O solvente utilizado na extração e preparo de fase móvel, a acetonitrila (ACN) (Mallinckrodt Backer, EUA), foi de grau HPLC, e os reagentes dodecil sulfato de sódio e fosfato de sódio monobásico (Sigma-Aldrich) foram de grau analítico.

No processo de extração do analito das matrizes foram utilizados fosfato de sódio monobásico (Sigma-Aldrich) e acetato de etila (AcETOH) grau HPLC (Lichrosolv, Merck). Para o *clean-up* dos extratos das amostras foi utilizado hexano grau analítico (Carlo Erba). As membranas de filtração de fluoreto polivinidileno (PVDF) de 0,22 µm de porosidade foram fornecidas pela empresa Nova Analítica, e utilizada na filtração dos extratos da amostra.

Os padrões analíticos FF e FFA foram fornecidos pela Sigma-Aldrich/Fluka, apresentando grau de pureza 99,0% e 99,8%, respectivamente.

Para a realização do ensaio com os peixes foi utilizado o produto comercial Aquaflor®, fornecido pela empresa MSD®, o qual contém 50% do fármaco (FF).

Preparo de soluções

As soluções estoque dos padrões analíticos foram preparadas em ACN na concentração de 1,0 mg/mL para FF e FFA. Estas soluções foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas em freezer a temperatura de - 20°C, por até 45 dias.

Soluções intermediárias de FF e FFA foram preparadas a partir das soluções estoque e as soluções de trabalho foram preparadas pela diluição apropriada das soluções intermediárias que apresentavam concentração de 300 µg/mL. As soluções de trabalho apresentavam concentrações de 0,02; 1,0; 10,0; 40,0 e 100 µg/mL. Estas soluções foram armazenadas em freezer à -20 °C, por até 15 dias.

Equipamentos utilizados

Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) com bomba quaternária, modelo 600E Waters, com amostrador automático, modelo 717 Waters, acoplado a detector de fluorescência (FLU), modelo 474 Waters. Foram monitorados os comprimentos de onda de 224 nm e 294 nm para emissão e excitação, respectivamente. O software utilizado para aquisição e tratamento de dados foi o Millennium 32, versão 4.0 (Waters, Miliford, USA).

Foi utilizado um agitador de tubos tipo vortex (DAIGGER-USA) para extração e *clean-up* das amostras e uma centrífuga com refrigeração (Eppendorf, modelo 5810R), para obtenção dos extratos das amostras.

Na evaporação foi utilizado o concentrador de amostras Centrivap (Labconco, EUA).

Preparo da amostra para determinação de florfenicol na ração

Foram pesados 3,00 g de amostra em tubos de polipropileno de 50 mL, adicionados 10,0 mL de AcETOH e agitados por 2 minutos em vortex. Estes tubos foram centrifugados a 3000 x g por 2 minutos, a 15 °C. Foram recolhidos 2,0 mL do sobrenadante, para evaporação até *secura total* em centrivap a 60 °C. Ao extrato seco, foram adicionados 1 mL de hexano e 1 mL de fase móvel (ácido fórmico 1% e acetonitrila, 70:30 v/v), agitado em vortex por 1 minuto e centrifugado a 3000 x g por 2 min, à 15 °C. O extrato inferior, referente à fase móvel, foi recolhido e filtrado em membranas de PVDF com porosidade de 0,22 µm de diâmetro, diretamente no vial, e injetado no sistema HPLC-FLU.

Preparo da amostra para determinação de FF e FFA no plasma

Alíquotas de 0,5 mL de plasma foram colocadas em tubos de polipropileno de 15 mL. Foram adicionados 0,5 ml de solução tampão fosfato (0,1M) pH 7, 0,5 mL de ACN e 5 mL de AcETOH. Levou-se à agitação por 5 min e em seguida centrifugação a 10.000 x g, por 5 min, a 15 °C. O AcETOH foi recolhido em outro tubo de polipropileno com capacidade para 15 mL e foi realizado nova extração no plasma pela adição de mais 5 mL de AcETOH. Os extratos foram combinados e evaporados até secura total em centrivap a 60 °C. Ao extrato seco foram adicionados 0,5 mL de fase móvel que foi agitado em vortex por 1 minuto. O extrato foi filtrado em membranas de PVDF com porosidade de 0,22 µm de diâmetro, diretamente no vial, e injetado no sistema HPLC-FLU. O fluxograma da marcha analítica está apresentado na Figura 2.

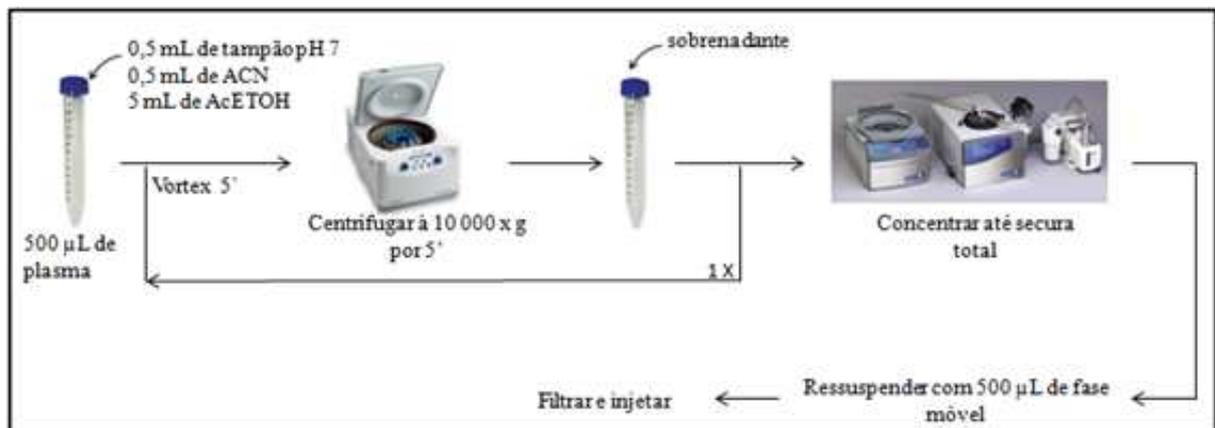


Figura 2. Fluxograma da marcha analítica para a determinação de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) em plasma de tabaqui.

Condições do sistema HPLC-FLU

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna analítica Xterra RP18 (4,6x150 mm, 5µm), Waters.

O volume de injeção empregado foi de 10 µL. A fase móvel utilizada foi de solução aquosa (0,01 M fosfato de sódio, 0,005 M SDS e 0,1% TEA, ajustado o pH à 4,8, com ácido fosfórico 85 %) e ACN, na proporção apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição da fase móvel e gradiente utilizado.

Tempo (minutos)	Solução aquosa %	ACN %
0	70	30
7,00	70	30
7,10	0	100
9,00	0	100
9,10	70	30
18,00	70	30

Legenda: ACN – acetonitrila

Validação dos métodos analíticos

A validação do método analítico utilizado para a determinação do nível de FF na ração baseou-se nas recomendações do Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012). A validação do método desenvolvido para a determinação de FF e FFA no plasma baseou-se no guia de validação de métodos analíticos estabelecido pelo MAPA (Brasil, 2011) e pela Comunidade Europeia (EC, 2002), onde são estabelecidos critérios de desempenho para métodos analíticos, destinados às análises de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal. Os parâmetros avaliados foram: linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão intra e interdias e exatidão. Foram também determinados os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) dos métodos.

Para a realização da validação, a fortificação das matrizes foi realizada com soluções de trabalho nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL de FF para a ração, e no plasma de 6,7 e 40 µg/mL para FF e FFA, respectivamente. Dessa forma, para cada nível de fortificação diferentes alíquotas foram tomadas para obter a concentração desejada.

A seletividade do método foi avaliada pela análise de 10 amostras branco, verificando nos cromatogramas a ausência de compostos com tempo de retenção igual ao dos analitos de interesse (FF na ração e FF e FFA no plasma).

Para a ração, a linearidade e sensibilidade foram estabelecidas a partir de curvas analíticas, obtidas pela análise em triplicata de amostras branco fortificadas com os analitos em 5 níveis de concentração (65; 125; 250; 375 e 500 mg /kg de ração) e para o plasma em 6

níveis de fortificação (LOQ, 0,1; 0,5; 1,0; 2,5 e 5 µg/mL). Os resultados foram expressos através do coeficiente de correlação linear (r) e pela inclinação da curva analítica, respectivamente para a linearidade e sensibilidade.

A eficiência de extração foi calculada através da comparação das áreas obtidas de amostras branco fortificadas nos níveis de concentração escolhidos, com as áreas obtidas da curva preparada com o extrato fortificado em cada nível de concentração.

O efeito matriz foi avaliado através da extração de amostras branco fortificadas com as soluções de padrão de FF para a ração e de FF e FFA para o plasma. O efeito matriz foi avaliado pela comparação estatística entre as concentrações médias determinadas no extrato fortificado e as concentrações médias dos analitos em solvente, utilizando teste F (Snedecor) para médias iguais e confirmação através de teste t (para amostras diferentes), em amostras que apresentam efeito matriz.

A precisão do método foi determinada através da repetitividade (intradia) e reprodutibilidade (interdia). A repetitividade foi expressa pelo coeficiente de variação (CV %) dos resultados de três replicatas, analisadas no mesmo dia pelo mesmo analista e usando o mesmo instrumento. A reprodutibilidade foi expressa pelo CV % dos resultados de três análises, realizadas em três dias diferentes (n=3) pelo mesmo analista e usando o mesmo instrumento.

A exatidão foi avaliada através de testes de recuperação, pela análise de amostras branco fortificadas nos níveis de concentração correspondentes. Os resultados foram expressos em função das concentrações que deveriam ser encontradas (quantidades nominais).

O limite de quantificação (LOQ) para FF na ração medicada e FF e FFA no plasma foram determinados experimentalmente. Para tanto, foram extraídas amostras (n=10 cada) contendo diversas concentrações dos analitos, e injetadas no sistema HPLC-FLU. O LOQ foi estabelecido considerando as amostras com menor concentração dos analitos que apresentaram coeficiente de variação (CV %) aceitáveis, conforme recomendação do MAPA (Brasil, 2011), segundo as faixas de concentração. O limite de detecção (LOD) no plasma foi determinado através da relação sinal ruído da linha de base na proporção 3 vezes a área do sinal em relação ao ruído da linha de base, conforme Paschoal *et al.* (2008).

Preparo da ração medicada

A ração medicada administrada aos peixes foi preparada pela dissolução do medicamento veterinário Aquaflor® 50% Premix Intervet (Schering-Plough), em óleo de soja comercial, a qual foi homogeneizada e imediatamente fornecida aos peixes.

O preparo da ração medicada foi realizado como apresentado na Tabela 2. A quantidade de ração foi calculada com base na biomassa, que é o peso vivo (pv), sendo utilizada 1,5% do total da biomassa.

Tabela 2. Formulação da ração medicada.

Ingrediente	Quantidade
Ração	1,5% da biomassa
Óleo	7% do total de ração
Aquaflor®	40 mg/kg

Peixes e condições experimentais

Foram utilizados 140 tambaquis ($247 \text{ g} \pm 38 \text{ g}$), saudáveis armazenados em sete caixas d'água com capacidade para 310 L de água ($n=20$ por cada caixa), com fluxo contínuo de água e aeração suplementar, no Biotério do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, do Centro de Aquicultura da Unesp, Caunesp, Jaboticabal, SP. A temperatura da água e o pH foram de $28,3 \pm 2,8 \text{ }^\circ\text{C}$ e $6,4 \pm 0,4$, respectivamente. Antes da administração do fármaco, os peixes foram aclimatados por uma semana e receberam ração comercial (3 % do pv dividido em duas vezes ao dia), a mesma utilizada no ensaio com o fármaco, todavia, isenta do medicamento. Cento e vinte peixes com peso médio de $246,5 \pm 10,2 \text{ g}$ receberam, por via oral, a ração medicada (dose nominal 40 mg de Aquaflor®/kg de pv– equivalente a 20 mg de FF/kg de pv). O grupo controle ($n=20$) (uma caixa) recebeu ração comercial isenta do antimicrobiano. Os peixes tiveram 3 mL de seu sangue colhido por punção do vaso caudal em 10 replicatas, nos tempos 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 24; 48; 72; 96; 144; 192 e 240 horas após a administração da ração medicada e após serem anestesiados em solução 5% de eugenol. As amostras de plasma foram armazenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento da análise, no laboratório de Toxicologia de Alimentos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual

de Campinas. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil, Protocolo número 3642-1(Anexo I).

Resultados e Discussão

Otimização da separação cromatográfica

Métodos para a determinação de FF e FFA em plasma de pescado têm sido relatados por alguns autores, utilizando HPLC com detectores de ultravioleta (Xie et al., 2012b) e espectrometria de massas (Lim, *et al.*, 2010).

Devido às características químicas das moléculas estudadas, a fase estacionária mais utilizada é a fase reversa. Assim, colunas C8, e C18 foram testadas, sendo que aquela que apresentou melhor separação dos compostos, e adequada simetria de picos para FF e FFA, foi a coluna analítica Xterra RP18.

Água, ácido fórmico 0,1% e tampão McIlvaine (ácido cítrico 0,1 mM / fosfato de sódio 0,1 mM) em seis níveis de pH (3, 4, 5, 6, 7 e 8) foram testados como fase aquosa para composição da fase móvel. ACN e MeOH foram os solventes orgânicos testados para composição da fase móvel. Em todas as composições testadas, a FFA não apresentou interação com as colunas analíticas testadas (C8, C18 e RP18), eluindo junto com o tempo morto.

A utilização de surfactante (SDS), em pH 4,5, possibilitou maior interação da amina com a coluna analítica. Esta técnica possibilitou a formação de complexos menos polares que o analito original, a FFA, promovendo assim, maior interação com a fase estacionária (Szepesi et al., 1990). Xie et al. (2011) também utilizaram a fase móvel composta por SDS a pH 4,5, na determinação de tianfenicol, florfenicol e florfenicol amina em ovos por HPLC-FLU utilizando coluna de fase reversa, C18.

O tempo de retenção da FFA foi de 3,8 minutos e do FF foi de 5,1 minutos (Figura 3). O tempo restante da corrida foi utilizado para limpeza da coluna e acondicionamento para a próxima corrida analítica.

Cabe mencionar que a maioria dos métodos relatados para a determinação de FF e FFA em pescados, por HPLC, utilizaram coluna analítica de fase reversa C8 e C18, e fase móvel composta por ACN como fase orgânica e como fase aquosa a água pura (Feng et al., 2008) ou, ainda, água acidificada (Anadón et al., 2008; Lim et al., 2010), basificada (Wrzesinski et al., 2006) ou solução tampão (Salvo et al., 2013). Porém, neste trabalho, pela

falta de interação da FFA com as colunas analíticas de fase reversa, essas composições de fase móvel não atenderam aos parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico.

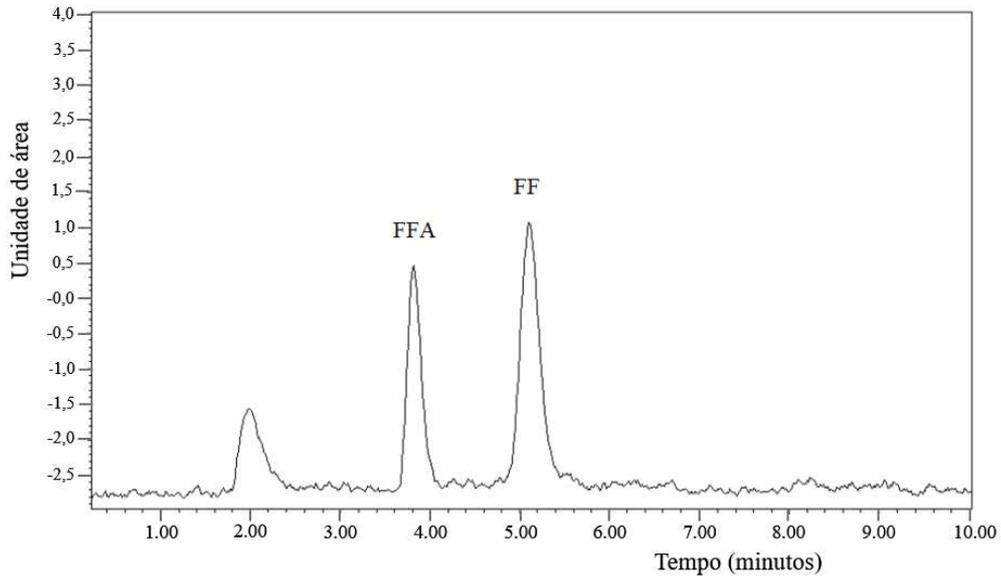


Figura 3. Cromatograma típico de florfenicol amina (FFA) e florfenicol (FF) na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ em ACN, em coluna Xterra RP18, de 5 μm (4,6x150 mm).

Desenvolvimento e validação do método analítico para determinação de FF na ração

O FF é solúvel em solventes de média e alta polaridade. Sua extração ocorre com solventes orgânicos como ACN, MeOH, AcETOH, dimetilformamida, acetona e glicerol formal (Anadón et al., 2008; Feng et al., 2008; Pouliquen et al., 2005; Wrzesinski et al., 2006; Xie et al., 2012a; Xie et al., 2012b). Assim, como solvente de extração, foram testados MeOH, etanol, acetona, ACN, AcETOH e hexano. O AcETOH foi escolhido por apresentar melhor recuperação do analito.

A administração do medicamento veterinário via ração, requer uma diluição prévia no óleo. Este serve tanto para solubilizar o fármaco como também evitar a lixiviação do fármaco na água. Foram utilizados 7% de óleo na formulação da ração medicada usada neste experimento. Assim, a composição da matriz a ser analisada apresentou uma elevada quantidade de lipídeos.

O método desenvolvido para a determinação de FF na ração foi simples, fácil e rápido, tendo unicamente sido necessário incluir uma etapa de *clean-up* para remoção de compostos lipídicos. O hexano foi escolhido, pois além de ser o mais apropriado para remoção de gordura, o FF apresenta baixa solubilidade neste solvente.

Os parâmetros de validação obtidos para o método de determinação de FF na ração são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros de validação do método para a determinação de florfenicol (FF) na ração medicada.

Parâmetros	FF
Faixa linear (mg/kg)	65 - 500
Linearidade (r)	0,997
Sensibilidade (au mg/ kg)	133,31
LOQ (mg/kg)	65
Efeito Matriz (%)	
65 (mg/kg)	16,42
250 (mg/kg)	13,10
500 (mg/kg)	11,91
Precisão Intradia (CV %)	
65 (mg/kg)	5,1
250 (mg/kg)	6,5
500 (mg/kg)	4,2
Precisão Interdia (CV %)	
65 (mg/kg)	11,4
250 (mg/kg)	8,2
500 (mg/kg)	9,4
Exatidão (%)	
65 (mg/kg)	108
125 (mg/kg)	83
250 (mg/kg)	79
375 (mg/kg)	85
500 (mg/kg)	91

Legenda: CV – coeficiente de variação; LOQ – limite de quantificação.

A seletividade foi avaliada pela comparação entre os cromatogramas obtidos pela análise de ração isenta de Aquaflor®, com a ração contendo o medicamento. Conforme pode ser observado na Figura 4, não foram verificados compostos com o mesmo tempo de retenção do analito de interesse (FF) indicando que o método foi seletivo.

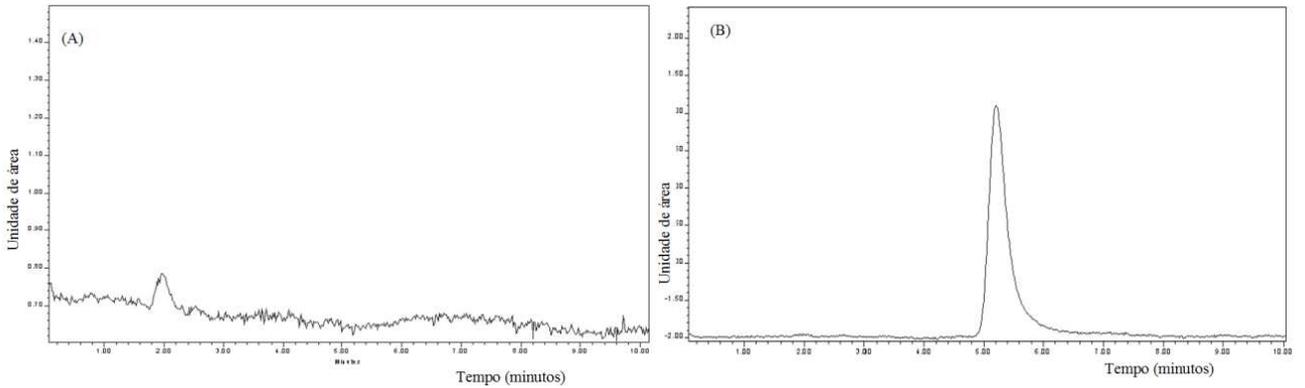


Figura 4. Cromatogramas da ração branco (A) e ração medicada (B) na concentração de 250 mg/kg.

Na determinação de FF na ração verificou-se efeito matriz, haja visto ter ocorrido perda de 11 à 16% de sinal (Tabela 3) quando comparada a presença de FF em solvente e no extrato. Sendo assim, optou-se por realizar a quantificação das amostras em curva matrizada. A curva matrizada apresentou-se linear na faixa de 65 a 500 mg/kg (Figura 5). A concentração de FF no Aquaflor® utilizado neste trabalho foi avaliada pela comparação com o padrão analítico de FF, 99%. Verificou-se que o medicamento veterinário possuía 50% de princípio ativo.

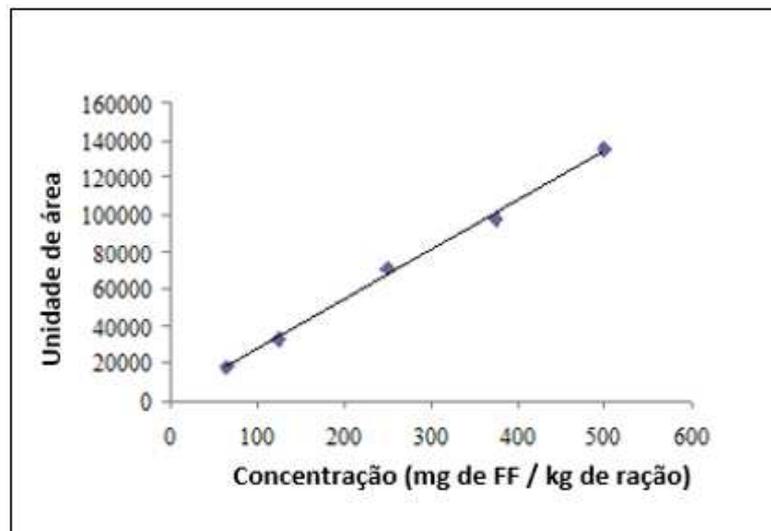


Figura 5. Curva matrizada de florfenicol (FF) na ração medicada.

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular da curva analítica. A sensibilidade obtida foi de 133,31 au mg/kg (Tabela 3), o que demonstra a adequada variação da resposta em função da concentração do analito. Não foi possível comparar a sensibilidade do nosso método com outros métodos haja visto não ter sido encontrado na literatura outro método de análise para FF em ração medicada. Cabe mencionar, entretanto, que este parâmetro não é considerado um parâmetro de validação nas diretrizes oficiais da EC e da ANVISA (Paschoal, et al., 2008).

A avaliação da exatidão de um método analítico pode ser realizada através da comparação dos resultados obtidos com aqueles obtidos através de outro método validado ou através da análise de um material de referência certificado, porém a indisponibilidade de outro método validado e de material de referência certificado levou à necessidade da aplicação do teste de recuperação para determinação da exatidão. Desta forma, comparou-se a concentração obtida no extrato com a obtida na matriz, através da quantificação na curva do extrato. A avaliação da exatidão pelo teste de recuperação é internacionalmente aceita se nenhum material de referência certificado estiver disponível (EC, 2002; Brasil, 2011). A recuperação obtida para o FF variou entre 79 - 108%, indicando o bom desempenho do método desenvolvido.

A precisão intradia (repetibilidade) e interdias (reprodutibilidade) foram expressas como CV % dos resultados obtidos com amostras fortificadas em triplicata, analisadas em condições de repetitividade intra e interdias. Os resultados obtidos (Tabela 3) atendem o Guia de Validação de métodos analíticos e bioanalíticos (ANVISA, 2012), que recomenda que, em condições de reprodutibilidade intralaboratorial, o valor de CV não deve exceder 15%.

O LOQ do método foi de 65 mg/kg. Amostras branco (n=10) foram fortificadas com FF no nível do LOQ e analisadas. O valor máximo de CV para os resultados obtidos (13,7%) corrobora a boa repetibilidade do método, e atende o Guia de Validação de referência, ANVISA (2012), que estabelece que valores de CV, na concentração em questão, não devem ser maiores que 15%.

Desenvolvimento e validação do método analítico para determinação de FF e FFA no plasma

Conforme mencionado, o FF é solúvel em solventes de média e alta polaridade. A FFA também é um composto solúvel em solventes de média e alta polaridade. Sua extração com solventes orgânicos ocorre quando em pH 7. Assim, alguns autores utilizam solução tampão para extração deste analito (Anadón et al., 2008; Lim et al., 2010; Xie et al., 2012 b).

Foram testados como solventes de extração: MeOH, etanol, acetona, ACN, AcETOH e hexano. Porém, o AcETOH, para o plasma, apresentou a melhor recuperação para ambos os analitos (FF e FFA).

Verificou-se que a etapa de agitação da amostra influenciou significativamente a recuperação dos analitos da matriz, principalmente a recuperação da FFA. Assim, foram necessários cinco minutos de agitação para melhorar sua recuperação.

O plasma é uma matriz que apresenta em sua constituição 91% de água, 7% de proteínas sanguíneas e 2% de compostos diversos (minerais, carboidratos, aminoácidos e lipídeos). Por ser uma matriz pouco complexa, não foi necessário inserir no método de extração uma etapa de *clean-up*.

O método desenvolvido foi validado para determinar a confiabilidade de seus resultados, sendo avaliados: seletividade, linearidade, efeito matriz, precisão intra e interdias, exatidão, LOQ e LOQ (Tabela 4).

A seletividade do método foi avaliada pela comparação entre os cromatogramas obtidos na análise de amostras branco e amostras branco fortificadas. Não foram verificados compostos com o mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse (FF, FFA), conforme pode ser observado na Figura 6, indicando que o método foi seletivo.

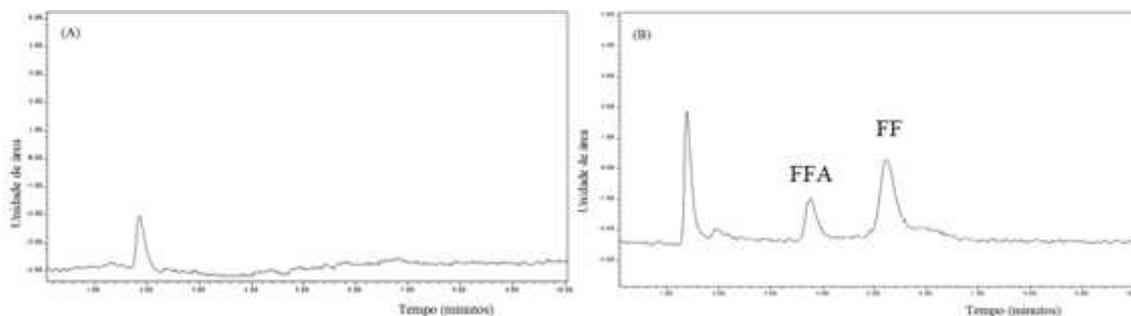


Figura 6. Cromatogramas (A) da matriz de plasma branco e (B) da matriz de plasma branco fortificada com florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) na concentração de 0,03 e 0,05 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Verificou-se ausência de efeito matriz para o FF e FFA em plasma de tabaqui, de maneira que seria possível a quantificação das amostras em uma curva realizada no solvente. Contudo, optou-se por realizar a quantificação das amostras na curva matrizada. A curva matrizada apresentou-se linear na faixa de 0,03 a 5,0 µg/mL para o FF e 0,05 a 5,0 µg/mL para o FFA (Figura 7).

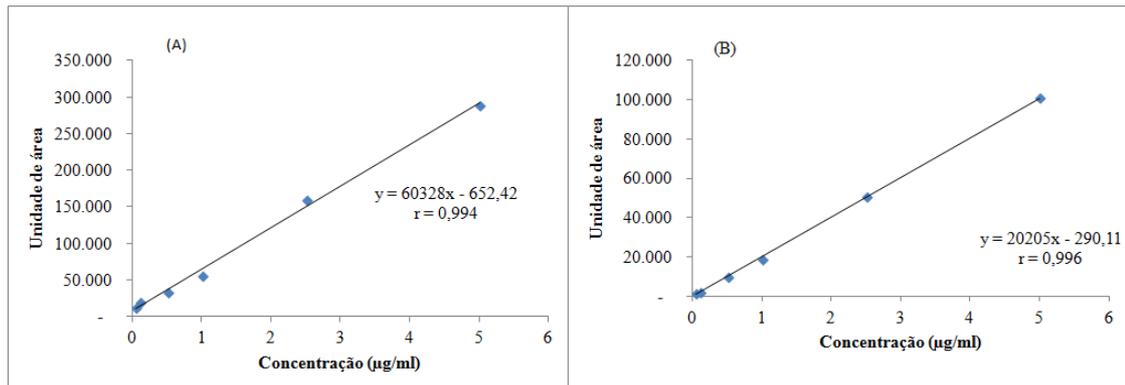


Figura 7. Curvas matrizadas do florfenicol (A) e florfenicol amina (B) no plasma.

A indisponibilidade de um material de referência certificado, para determinação da exatidão de FF e FFA em plasma de tabaqui, levou à necessidade da aplicação do teste de recuperação para obtenção deste parâmetro. Desta forma, comparou-se a concentração obtida no extrato, com a concentração obtida na matriz, através da quantificação na curva do extrato.

A recuperação obtida para o FF variou entre 86 - 94%, indicando o bom desempenho do método desenvolvido para esse analito. Entretanto, a FFA apresentou menor recuperação, 50 - 69%, tendo sido realizados diversos testes com objetivo de melhorar essa taxa de recuperação, porém os resultados encontrados não apresentaram bom êxito. Este fato se deve à característica desta molécula que apresenta características químicas semelhantes à das proteínas, proporcionando elevada afinidade com a matriz, o que justificou a necessidade de uso de curva matrizada para a determinação deste analito

Tabela 4. Parâmetros de validação do método para a determinação de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) em plasma de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Parâmetros	FF	FFA
Faixa linear ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ - 5	LOQ - 5
Linearidade (r)	0,994	0,996
Sensibilidade (au mg/ Kg)	60328	20205
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0,01	0,02
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,03	0,05
Efeito Matriz (%)	Não observado	Não observado
Precisão (CV%) Intradia		
LOQ	9,0	14,0
1,0 ($\mu\text{g/mL}$)	13,2	16,5
5,0 ($\mu\text{g/mL}$)	10,5	19,7
Precisão (CV%) Interdia		
LOQ	10,8	13,7
1,0 ($\mu\text{g/mL}$)	14,3	19,7
5,0 ($\mu\text{g/mL}$)	14,9	21,1
Exatidão (%)		
LOQ	86	50
0,1 ($\mu\text{g/mL}$)	89	67
0,5 ($\mu\text{g/mL}$)	87	60
1,0 ($\mu\text{g/mL}$)	93	54
2,5 ($\mu\text{g/mL}$)	86	63

Legenda: CV – coeficiente de variação; LOD – limite de detecção; LOQ – limite de quantificação.

A precisão intradia (repetibilidade) e interdias (reprodutibilidade) foram expressas em CV% dos resultados obtidos com amostras fortificadas em triplicata. Os resultados obtidos (Tabela 4) atendem os Guias de Validação da Comunidade Europeia (EC, 2002) e do MAPA (Brasil, 2011) que recomendam que, em condições de reprodutibilidade, o valor de CV não deve exceder 30% para concentrações do analito menores que 10 $\mu\text{g/mL}$.

Os valores de LOD e LOQ foram de 0,01 e 0,03 $\mu\text{g/mL}$ para o FF e de 0,02 e 0,05 $\mu\text{g/mL}$ para a FFA. Amostras branco (n=10) foram fortificadas com FF e FFA no nível do LOQ e analisadas. O valor máximo de CV para os resultados obtidos, 18,7 e 21,3% para FF e FFA respectivamente, corrobora a boa repetibilidade do método, e atende o Guia de

Validação do MAPA (Brasil, 2011), que estabelece que valores de CV não devem ser maiores que 35% para concentrações do analito menores que 1 µg/mL.

Análise da ração medicada e dose administrada no ensaio farmacocinético

O método desenvolvido e validado foi utilizado para analisar a ração medicada, em triplicata. A concentração de FF verificada foi de 1.402,46 mg/kg. Assim, considerando a biomassa de peixes em cada caixa e a quantidade de ração administrada, calculou-se que a dose de FF efetivamente administrada foi de 21,0 mg/kg de pv.

Análise do plasma

Os resultados verificados no ensaio de farmacocinética são apresentados na Tabela 5 e Figura 8. Os parâmetros obtidos encontram-se na Tabela 6.

Tabela 5. Concentração de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) em plasma de tambaqui após administração via oral de 21,0 mg de FF/kg de peso vivo (n=10).

Tempo (hora)	FF (µg/mL)	FFA (µg/mL)
0,5	1,562 ± 0,329	0,463 ± 0,136
1	1,546 ± 0,202	0,524 ± 0,218
2	1,535 ± 0,630	0,783 ± 0,057
4	2,017 ± 0,727	0,739 ± 0,345
8	2,052 ± 0,613	1,276 ± 0,228
12	2,426 ± 0,337	1,552 ± 0,292
24	1,166 ± 0,491	0,660 ± 0,187
48	0,204 ± 0,055	0,165 ± 0,094
96	0,144 ± 0,076	0,075 ± 0,054
144	0,136 ± 0,027	< LOQ
192	0,086 ± 0,022	< LOQ
240	< LOQ	< LOQ

Tabela 6. Parâmetros farmacocinéticos determinados no plasma após única administração oral de florfenicol (FF) (21,0 mg/kg de peso vivo) em tambaqui (*Colossoma Macropomum*) (n=10).

Parâmetros	Unidades	FF	FFA
AUC _{0→t}	h.µg/mL	100,97	66,67
AUC _{0→∞}	h.µg/mL	105,18	69,14
C _{máx}	µg/mL	2,426	1,552
T _{1/2}	h	32,4	21,4
T _{máx}	h	12	12
K _e	1/h	0,02	0,03
V _d (area)	L/ kg	8,29	7,66
Cl	L.h/kg	0,19	0,29

Legenda: AUC - área sob a curva; C_{máx} - concentração máxima; T_{1/2} - tempo de meia-vida; T_{máx} - tempo máximo; K_e - constante de eliminação; V_d (area) - volume de distribuição aparente; Cl - clearance; FFA - florfenicol amina.

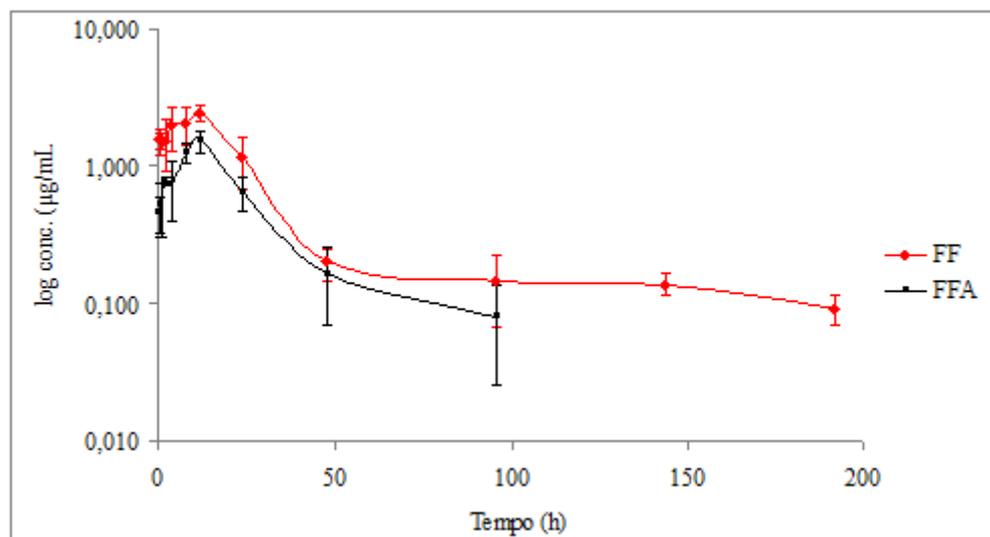


Figura 8. Concentração de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA), em plasma de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após administração, via oral através de ração medicada, de 21,0 mg de FF/kg de peso vivo.

Na literatura são relatados artigos sobre farmacocinética de FF com diferentes espécies de peixes (*Ictalurus punctatus*, *Solurus asotus*, *Carassius auratus cuvieri*, *Monopterus albus*, *Paralichthys olivaceus*, *Piaractus brachypomus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Pagrus pagrus*, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus*), e diferentes doses de tratamento (5 a 40 mg de FF/kg pv), diferentes vias de administração (via oral, intramuscular e endovenosa) e em diferentes condições ambientais (temperatura, salinidade e pH) (Feng et al., 2008; Feng et al.,

2009; Gaikowski et al., 2009; Lewbart et al., 2005; Lim et al., 2010; Park et al., 2006; Salvo et al., 2013; Wrzesinski et al., 2006; Xie et al., 2012b; Zhao et al., 2010). As variáveis acima mencionadas, acopladas à variabilidade intra-espécie, afetam significativamente os parâmetros farmacocinéticos e precisam efetivamente ser levados em consideração, uma vez que a diversidade de resultados relatados pelos autores, como por exemplo, a concentração máxima de FF encontrada no plasma, que variou de 1,09 a 29,32 µg/mL.

Estudos de dose única com FF foram realizados em várias espécies de peixes e, principalmente, com tilápias e trutas. No entanto, não há estudos com espécies amazônicas, que permitam uma comparação mais próxima com a espécie estudada neste trabalho. O tambaqui requer temperatura elevada (26 - 32°C) para ótimo desenvolvimento, e alimentação frugívora e onívora, características essas que precisam ser levadas em consideração na avaliação da absorção de fármacos.

A concentração máxima encontrada neste trabalho, quando se administrou 21,0 mg de FF/kg de pv, em dose única, foi de 2,426 e 1,552 µg/mL, para o FF e seu metabólito, a FFA, respectivamente. O tempo necessário para atingir esta concentração máxima do FF e seu metabólito foi de 12 horas.

Hosberg et al. (1994), estudaram a distribuição de ¹⁴C-FF nos tecidos, por radioatividade e também por análise cromatográfica (HPLC-UV), e relataram uma rápida biotransformação do FF, com rápido decaimento no sangue e no músculo e lento no rim e no olho de salmão do atlântico, após administração via oral de 10 mg de FF/kg de pv.

Em nosso estudo, a concentração de FF e FFA após a C_{max}, 12 horas após a administração do FF, diminuiu rapidamente, com meia-vida de 32,4 horas para o FF e 21,4 horas para o FFA, sendo que nos tempos de coleta a partir de 144 h, a concentração de FFA no plasma esteve abaixo do LOQ do método analítico (0,05 µg/mL) não sendo, portanto, possível a sua quantificação.

A FFA é o metabólito mais importante na administração de FF em bovinos (Sams, 1994), aves (Anadón, 2008), suínos (Jiancheng et al., 2006), cães (Park et al., 2008) e também em peixes (Gaikowski et al., 2010; Hosberg, 1994; Hormazabal et al., 1993). Sabe-se que a FFA é considerada internacionalmente um resíduo marcador do FF.

Os resultados obtidos neste trabalho, expressos através dos parâmetros farmacocinéticos foram significativamente menores aos já relatados por outros autores. Park et al. (2006) administraram, por via oral, 20 mg de FF/kg de pv, em Bagre (*Silurus asotus*). As C_{máx} e t_{máx} encontradas foram de 13,19 µg/mL e 8 horas, respectivamente, resultado 70%

maior do que a $C_{m\acute{a}x}$ verificada no presente estudo. Vale ressaltar que a temperatura de desenvolvimento do experimento realizado por esses autores foi de 23°C, sendo o tempo de resid\ecancia de f\armacos \e maior em temperaturas mais baixas. Lim et al. (2010) tamb\em administraram 20 mg de FF/kg de pv, por\em em Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) e por via intramuscular. As $C_{m\acute{a}x}$ e $t_{m\acute{a}x}$ encontradas por esses autores foram de 12,81 $\mu\text{g/mL}$ e 4 horas, respectivamente, resultado 69% maior do que a concentra\c3o verificada neste trabalho. A temperatura de desenvolvimento do experimento, nesse trabalho citado, foi de 18,5°C.

A $C_{m\acute{a}x}$ observada no presente estudo, menor do que a de outros estudos explicita uma r\apida absor\c3o e elimina\c3o ou ainda uma baixa absor\c3o, deste f\armaco no plasma de tambaqui. Verifica-se a influ\ecncia do metabolismo e da temperatura mais elevada, no favorecimento da elimina\c3o do FF. Esse resultado \e de extrema import\ancia na previs\ao de resultados cl\nicos para o tratamento de bacterioses.

Para o tratamento de bacterioses, a efici\ecncia de um f\armaco est\ diretamente ligada \a sua capacidade de alcan\ar e manter a concentra\c3o no local da infec\c3o, e neste estudo, o f\armaco foi disponibilizado por via oral para atingir o local de infec\c3o (m\sculo). Sendo assim, o plasma possui um papel importante na transfer\ecncia para o tecido alvo.

Os f\armacos apresentam uma concentra\c3o m\nima inibit\oria (MIC) para impedir o desenvolvimento das bact\erias alvo. Essa \e a medida para o c\culo da dosagem e tratamento de enfermidades, conforme sugerem Shojaee Aliabadi & Lees (2000), que alertam que a MIC deve ser mantida no tecido alvo durante todo o tratamento.

Yanong et al. (2005), relataram MIC's para o FF em *Streptococcus* sp e *Aeromonas* sp. Para tanto, foram avaliadas seis cepas de *Streptococcus* sp e tr\es cepas de *Aeromonas* sp. Os MIC's determinados variaram entre ≤ 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$. Comparando estes valores com os valores encontrados no presente estudo, verifica-se que ap\os a administra\c3o por via oral de 21,0 mg de FF por kg de pv, a $C_{m\acute{a}x}$ obtida em 12 horas, atinge essa concentra\c3o inibit\oria no plasma, sendo necess\rio verificar a concentra\c3o atingida no m\sculo, que \e o local alvo das bact\erias, e onde precisa ser atingida essa concentra\c3o.

Gaunt et al. (2011) apresentaram valores de MIC's para FF em bact\erias obtidas da cria\c3o de bagres e til\apias. Para *Edwardsiella ictaluri* a MIC encontrada foi de 0,25 $\mu\text{g/mL}$, para *Flavobacterium columnare* de 0,5 – 1,0 $\mu\text{g/mL}$, para *Streptococcus iniae* e *Streptococcus agalactiae* de 2,0 – 4,0 $\mu\text{g/mL}$, e para *Aeromonas hydrophila* de 0,5 – 4,0 $\mu\text{g/mL}$. Segundo estes valores, a concentra\c3o m\axima de FF encontrada no plasma, no presente trabalho, atinge essa concentra\c3o inibit\oria necess\ria para controlar a bacteriose, por\em o m\sculo \e

o alvo dessas bactérias, precisando então ser avaliada a concentração neste tecido para eficácia no tratamento dessas bactérias.

Conclusões

Os métodos analíticos desenvolvidos e validados para a determinação de FF na ração e FF e FFA no plasma de tambaqui apresentaram-se adequados, estando em conformidade com os guias de validação utilizados como referência no presente estudo.

O FF apresentou alta taxa de conversão em FFA no plasma, o que indica uma elevada biotransformação do FF, com tempo de meia de vida de 32,4 e 21,4 horas e constante de eliminação de 0,02 e 0,03 1/h, para o FF e a FFA, respectivamente.

Referências Bibliográficas

- Anadón, A.; Martínéz, M.A.; Martínéz, M.; Ríos, A.; Caballero, V.; Ares I.; Martínéz-Larrañaga, M.R. Plasma and Tissue Depletion of Florfenicol and Florfenicol-amine in Chickens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11049-11056, 2008.
- ANVISA, 2012. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N.º 27, de 17 de maio de 2012. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/54310004b60537e891f9baf8fded4db/RDC+27+12+Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>>. Acessado em 16.04.2015.
- Brasil, 2010. Ministério da Pesca e Aquicultura. Disponível em <http://www.mpa.gov.br/files/docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%C3%ADstico%20MPA%202010.pdf>. Acessado em 02.11.2015.
- Brasil, 2011. Ministério da Pesca e Aquicultura. <<http://www.mpa.gov.br/ultimas-noticias/885-mpa-lanca-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2011>>. Acessado em 01.09.2015.
- Brasil, 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Gui>

a%20de%20valida%C3%A7%C3%A3o%20e%20controle%20de%20qualidade%20analitica.pdf> . Acessado em 14.04.2015.

- Brasil, 2013. Ministério da Pesca e Aquicultura. Disponível em <<http://www.mpa.gov.br/#aquicultura/informacoes/potencial-brasileiro>>. Acessado em 12.03.2013.
- Bowker, J.D.; Ostland, V.E.; Carty, D.; Bowman, M.P. Effectiveness of Aquaflo® (50% Florfenicol) to Control Mortality Associated with *Streptococcus iniae* in Freshwater-Reared Subadult Sunshine Bass. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 22, p. 254-265, 2010.
- EC, 2002. European Commission. Official Journal of the European Communities, 17/08/2002, L221/8-36. Disponível em <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/vet_mrl_search.jsp&murl=menus/regulations/regulations.jsp&mid=WC0b01ac058006488e>. Acessado em 23.07.2014.
- Feng, J.B.; Jia, X.P.; Li, L.D. Tissue distribution and elimination of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) after a single oral administration in freshwater and seawater at 28 °C. **Aquaculture**, v. 276, p. 29-35, 2008.
- Feng, J.B.; Jia X.P. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) held in freshwater at 22 °C. **Aquaculture**, v. 289, p. 129-133, 2009.
- Gaikowski, M.P.; Mushtaq, M.; Cassidy, P.; Meinertz, J.R.; Schleis, S.M.; Sweeney, D.; Endris, R.G. Depletion of Florfenicol amine, marker residue Florfenicol, from the edible fillet of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. niloticus* and *O. niloticus* × *O. aureus*) following Florfenicol administration feed. **Aquaculture**, v. 301, p. 1-6, 2009.
- Gaikowski, M.P.; Wolf, J.C.; Schleis, S.M.; Tuomari, D.; Endris, R.G. Safety of florfenicol administered in feed to tilapia (*Oreochromis* sp.). **Toxicologic pathology**, v. 41, n.4, p. 639-652, 2013.
- Gaunt, P.S. Boas práticas para o tratamento de patógenos em peixes de água quente com uso de ração medicada com Aquaflo® (florfenicol). MSD – Saúde animal, Doenças

- Bacterianas em Peixes de Água Quente: Novas Estratégias para o Controle Sustentável, p. 28-34, 2011.
- Graham, R.; Palmer, D; Pratt, B.C.; Hart, C.A. In vitro activity of florfenicol. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 691–694, 1988.
- Hormazabal, V.; Steffenak, I.; Yndestad, M. Simultaneous determination of residues of florfenicol and florfenicol amine in fish tissues by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 616, p. 161-165, 1993.
- Horsberg, T.E.; Martinsen, B.; Varma, K.J. The disposition of ¹⁴C-florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 122, p. 97-106, 1994.
- Jiancheng, L.; Shuangyang, D.; Suxia, Z.; Cun, L.; Xiaowei, L.; Zhongwei, L.; Jianzhong, S. Residue Depletion of Florfenicol and its metabolite florfenicol amine in swine tissues after intramuscular administration. **Journal of Food Chemistry**, v. 54, p. 9614-9619, 2006.
- Lewbart, G.A.; Papich, M.G.; Whitt-Smith, D. Pharmacokinetics of florfenicol in the red pacu (*Piaractus brachypomus*) after single dose intramuscular administration. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**, v. 28, p. 317–319, 2005.
- Lim, J.H.; Kim, M.S.; Hwang, Y.H.; Song, I.B.; Park, B.K.; Yun, H.I. Plasma and tissue depletion of florfenicol in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration. **Aquaculture**, v. 307, p. 71-74, 2010.
- Malta, J.C.O.; Gomes, A.L.S.; Andrade, S.M.S. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, (*Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae*) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia central. **Acta Amazonica**, v. 31, p.133-143, 2001.
- Paschoal, J.A.R.; Rath, S.; Airoidi, F.P.S.; Reyes, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.
- Park, B.K.; Lim, J.H.; Kim, M.S.; Yun, H.I. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in the Korean catfish (*Silurus asotus*). **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**, v. 29, p. 37–40, 2006.

- Park, B.K.; Lim, J.H.; Kim, M.S.; Hwang, Y.H.; Yun H.I. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 85–89, 2008.
- Pouliquen, H.; Morvan, M.L. Determination of Florfenicol in Freshwater, Sediments and Bryophyte *Fontinalis antipyretica* by HPLC with Fluorescence Detection. **Chromatographia**, v. 62, p. 5-6, 2005.
- Salvo, A.D.; Della Rocca, G.; Terzetti, E.; Malvisi J. Florfenicol depletion in edible tissue of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and sea bream, *Sparus aurata* L. **Journal of Fish Diseases**, 2013.
- Sams, R.A. Florfenicol: Chemistry and metabolism of a novel broad-spectrum antibiotic. In: Proceedings of the 18th World Buiatrics Congress, Bologna, Italy, p. 13-17, 1994.
- Shojaee Aliabadi, F.; Lees, P. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimisation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, p. 307–313, 2000.
- Silva, C.M.A. 2001. Bactérias gram-negativas isoladas do tambaqui, *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1818) criado em cativeiro, Amazonas-Brasil. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas, 66 p, 2001.
- Szepesi, G.; Gazdag, M.; Mihalyfi, K. Selection of high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography**, v. 464, p. 265-278, 1990.
- Wrzesinski, C.; Crouch, L.; Gaunt, P.; Holifield, D.; Bertrand, N.; Endris, R. Florfenicol residue depletion in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Aquaculture**, v. 253, p. 309-316, 2006.
- Xie, K.; Jia, L.; Yao, Y.; Xub, D.; Chen, S.; Xie, X.; Pei, Y.; Bao, W.; Dai, G.; Wang, J.; Liud, Z. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in eggs by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 2351– 2354, 2011.
- Xie, K.; Guo, H.; Jia, L.; Huang, Y.; Xie, X.; Yao, Y.; Xu, D.; Chen, X.; Dai, G.; Zhang, X.; Sun, Y.; Wang, J.; Liu, Z. Residue Depletion of Florfenicol and its metabolite

Florfenicol amine in eggs. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, p. 1012-1017, 2012a.

Xie, L.L.; Wu, Z.X.; Chen, X.X.; Li, Q.; Yuan, J.; Liu, H.; Yang, Y. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in rice field eel (*Monopterus albus*) after a single-dose intramuscular or oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 36, p. 229-35, 2012b.

Yanong, R.P.E.; Curtis, E.W.; Simmons, R.; Bhattaram, V.A.; Gopalakrishnan, M.; Ketabi, N.; Nagaraja, N.V.; Derendorf, H. Pharmacokinetic studies of florfenicol in koi carp and threespot gourami *Trichogaster trichopterus* after oral and intramuscular treatment. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 17, p. 129–137, 2005.

Zhao, H.Y.; Zhang, G.H.; Bai, L.; Zhu, S.; Shan, Q.; Zeng, D.P.; Sun Y.X. Pharmacokinetics of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus cuvieri*) after a single intramuscular or oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, p. 460-463, 2010.

CAPÍTULO III

Depleção de resíduos do florfenicol e florfenicol amina em músculo de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Luciana da Conceição Castello Branco; Fabiana Pilarski; Edsandra Campos Chagas; Vera Lúcia Ferracini; Felix Guillermo Reyes Reyes

Este capítulo será submetido para publicação na *Aquaculture*

**Depleção de resíduos do florfenicol e florfenicol amina em músculo de tambaqui
(*Colossoma macropomum*)**

Resumo

O uso de florfenicol (FF) na aquicultura é amplamente difundido, principalmente para tratamento da estreptococose em tilápias. Este antimicrobiano sintético é de uso exclusivo na medicina veterinária, e foi desenvolvido para substituir o cloranfenicol, o qual induz anemia aplásica. O FF apresenta amplo espectro de ação contra as principais bactérias que acometem peixes de criação. Entretanto, não são encontrados na literatura estudos de depleção deste antimicrobiano, com espécies nativas da região amazônica do Brasil. O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a segunda espécie de águas continentais, mais comercializada no Brasil e estudos com esta espécie são necessários e trazem benefícios não só para o produtor e os consumidores com foco na inocuidade dos alimentos, mas também para a garantia do mercado explorador dessa *commodity* alimentar. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a depleção do FF em tambaqui e seu metabólito, a florfenicol amina (FFA), no músculo de tambaqui. Para tanto, o antimicrobiano foi administrado por via oral, na ração, na dose de 10 mg/kg de peso vivo, durante 10 dias. O músculo desses animais foi coletado nos tempos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 16, 21 e 28 dias, após a administração da ração medicada. Foi desenvolvido método analítico para quantificação de FF e florfenicol amina (FFA), seu metabólito, no músculo, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um analisador de massas (HPLC – MS/MS). O método analítico foi validado, tendo apresentado valores de parâmetros de validação em conformidade com os guias de validação da Comunidade Europeia e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, assim como baixos limites de detecção e quantificação para os analitos estudados. Após o período de tratamento, já no primeiro dia de coleta foram verificados níveis de resíduos de FF e FFA menores que o limite máximo de resíduo permitido. A maior concentração encontrada de FF somado à FFA foi de 238,2 ng/g. Esta baixa concentração indica uma baixa absorção de FF no músculo.

Palavras-chave: Florfenicol, Florfenicol amina, depleção, *Colossoma macropomun*, HPLC-MS/Iontrap.

**Depletion of residues of florfenicol and florfenicol amine in the muscles of tambaqui
(*Colossoma macropomum*)**

Abstract

The use of florfenicol (FF) in aquaculture is amply broadcast, mainly about the treatment of streptococcus in tilapias. This synthetic antibiotic is used exclusively in veterinary medicine, and was developed in order to substitute chloramphenicol, which induces aplastic anemia. FF shows a wide range of actions against bacteria, mainly against the main bacterial infections that attack fish farm. However, studies of the depletion of this antibacterial in the native species of the Amazon region of our country are not found in literature. The tambaqui is the second most commercialized inland water species in Brazil, and the studies of this species are necessary and bring benefits not only to the producer and the consumers with a focus on the safety of foods, but also for the guarantee of the exporting market of this food commodity. Hence, the objective of this study was to evaluate the depletion of FF in tambaqui. Therefore, the antimicrobial was administered orally, in the feed, at a dose of 10mg/kg b.w., during 10 days. The muscles of these animals were collected at intervals of : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 16, 21, and 28 days after the administration of the medicated feed. An analytical method was developed for the quantification of FF and florfenicol amine (FFA), its metabolite, in the muscle, using a highly performance liquid chromatograph coupled with a mass analyzer (HPLC – MS/MS). The analytical method was validated, having shown parameter values of validation conforming to the validation guides of the European Community and the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply of Brazil, having as well low detection and quantification limits for the studied analytes. After the treatment period, already on the first day of collection, lower residue levels of FF and FFA than the maximum permitted residue limit were verified. The highest concentration of the sum of FF and FFA found was 238.2 ng/g. This low concentration indicates a low absorption of FF in the muscle.

Key words: Florfenicol, Florfenicol amine, Withdrawal period, *Colossoma macropomun*, HPLC-MS/Iontrap.

Introdução

O sistema de produção intensiva é caracterizado pelas altas densidades de peixes e podem propiciar problemas nutricionais e de enfermidades infecciosas e parasitárias, de grande preocupação na piscicultura. A propensão de transmissão de doenças e a proximidade dos animais em sistemas intensivos e semi-intensivos facilitam a disseminação dessas doenças são um dos principais obstáculos sanitários e produtivos (Malta et al., 2001; Silva, 2001). Sendo assim, a utilização de antimicrobianos se faz necessária para tratamento dessas doenças.

No Brasil, existem unicamente dois antimicrobianos aprovados para uso na aquicultura: florfenicol (FF) e oxitetraciclina. O FF é um antimicrobiano sintético de amplo espectro destinado apenas para uso veterinário. Sua utilização na piscicultura é aprovada em diversos países como Estados Unidos, Canadá, Brasil, Japão e também pela Comunidade Européia.

Derivado do tianfenicol, que contém um átomo de flúor no carbono três ao invés do grupo hidroxila (Graham et al., 1988), o FF (Figura 1) possui maior espectro de ação, ausência de inconvenientes de resistência bacteriana e não induz anemia aplásica como o cloranfenicol. A florfenicol amina (FFA) (Figura 1) é o principal produto de biotransformação do FF em organismos aquáticos.

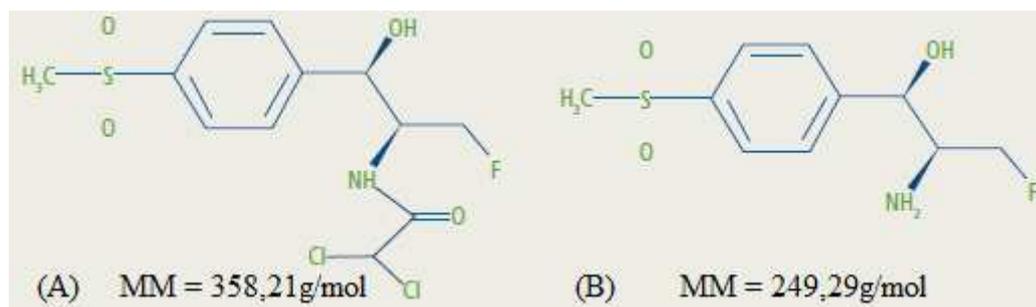


Figura 1. Estrutura química e massa molecular do florfenicol (A) e da florfenicol amina (B).

Fonte: Gaikowskiet al.(2010).

Na aquicultura, o FF é indicado para o controle de enfermidades associadas aos patógenos bacterianos *Edwardsiella ictaluri*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Flavobacterium columnare* e *Aeromonas hydrophila* (Schering-Plough, 2015).

O medicamento veterinário comercializado no mercado, que contém FF, contém uma concentração de 50% do princípio ativo. O limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido

para FF em pescado, em diversos países, é de 1000 µg/kg. A Comunidade Europeia (Regulamento CEE Nº 2377/90; EC, 1990), assim como os Estados Unidos (FDA, 2015), estabelecem que o valor de LMR se refere ao somatório de resíduos do FF e FFA, no músculo e pele em proporções naturais. No Brasil, é estabelecido Limite de Referência para Tomada de Ação Regulatória (LRTAR), sendo que para o FF, por se tratar de substância registrada para uso na espécie-alvo, é adotado o respectivo LMR estabelecido pela Comunidade Europeia. Entretanto, não está especificado que o LRTAR se refira ao somatório de resíduos do FF e FFA no músculo e pele em proporções naturais (Brasil, 2014).

Frequentemente observa-se, nas diversas espécies animais, que um mesmo medicamento, administrado na mesma forma farmacêutica, resulta em diferenças nos processos farmacocinéticos e na sensibilidade farmacodinâmica dos sítios de ação tecidual entre as espécies. Mesmo dentro de uma mesma espécie, quando adaptados a condições diferentes nota-se variações. Portanto, são necessários estudos de depleção de resíduos na determinação e ajuste do período de carência, que precisa ser determinado para cada fármaco, em cada espécie.

Na literatura, encontram-se alguns artigos que apresentam resultados de depleção de resíduos do FF e FFA, em diferentes espécies de pescado (bagre, Olive flounder, Truta arco-íris, Pargo e Tilápia). Entretanto, apesar de ter sido utilizada a mesma dose de FF (10 mg/kg peso vivo), verifica-se que o período de carência relatado variou entre zero (Feng et al., 2008; Feng et al., 2009, Schering-Plough, 2015), quatro (Salvo et al., 2013) e sete dias (Wrzesinski et al., 2006; Gaikowski et al., 2010), para peixes de águas continentais, e oito dias (Lim et al., 2010) para peixe de águas marinhas. Deve-se levar em conta ainda que a diferença entre as espécies e tamanho do peixe utilizado no ensaio, influenciam na absorção.

Estudos realizados para determinação do período de carência do medicamento veterinário disponível no mercado, o Aquaflor®, mostraram que após 48 h da última administração do medicamento, os resíduos de FF e FFA, já se encontram abaixo do LRTAR estabelecido em nosso país. Porém, a recomendação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é de um período de carência de 14 dias (Schering-plough, 2015).

Estudos de depleção de resíduos são necessários e devem ser realizados com cada espécie a qual se destine o fármaco veterinário. Desta forma, se conhece o tempo que o fármaco estará presente no animal para efetivamente atuar no tratamento da bacteriose envolvida e em quanto tempo ele é eliminado, visto que a distribuição e a eliminação são influenciadas pelas diferenças metabólicas de cada espécie.

Para realização desses estudos, métodos cromatográficos são amplamente utilizados devido aos baixos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) necessários para acompanhar com maior detalhe a concentração de fármacos nos tecidos analisados.

Na literatura, são relatados diversos métodos analíticos para determinação de FF em músculo de pescado, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) associada a detectores de ultravioleta (Feng et al., 2008; Feng et al., 2009; Xie et al., 2012), ou ainda associado à espectrometria de massas (LC-MS) (Lim et al., 2010; Park et al., 2006).

Para a quantificação de resíduos de contaminantes em matrizes complexas (como alimentos), são preferencialmente empregadas técnicas de detecção seletivas, como fluorescência (FLU) e espectrometria de massas, por possuírem características de alta seletividade e detectabilidade.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a depleção de resíduos de FF, e de seu metabólito (FFA), no músculo de tambaqui, após sua administração por via oral (através da ração). Para tanto, foi desenvolvido e validado método analítico, para quantificação dos analitos mencionados, utilizando cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Material e Métodos

Solventes e Reagentes

O solvente utilizado na extração e preparo da fase móvel, a acetonitrila foi de grau HPLC (Mallinckrodt Backer, EUA) e o ácido fórmico de grau analítico (Sigma-Aldrich).

Os solventes utilizados no processo de extração foram o fosfato de sódio monobásico (Sigma-Aldrich) e acetato de etila (AcETOH) grau HPLC (Lichrosolv, Merck). Para o *clean-up* das amostras foi utilizado hexano grau analítico (Carlo Erba). As membranas de filtração de Fluoreto Polivinidileno (PVDF) de 0,22 µm de porosidade foram fornecidas pela empresa Nova Analítica, e utilizada na filtração dos extratos da amostra.

Os padrões analíticos de FF e FFA foram fornecidos pela Sigma-Aldrich/Fluka, apresentando grau de pureza 99% e 99,8%, respectivamente.

A cerâmica utilizada no auxílio à homogeneização do músculo foram fornecidas pela Agilent (USA), número de identificação 5982-9312, para tubos de 15 mL.

Preparo de soluções

As soluções estoque dos padrões analíticos foram preparadas em ACN na concentração de 1,0 mg/mL para FF e FFA. Estas soluções foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas em freezer a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, por até 45 dias.

Soluções intermediárias de FF e FFA foram preparadas a partir das soluções estoque e as soluções de trabalho foram preparadas pela diluição apropriada das soluções intermediárias que apresentavam concentração de 300,0 $\mu\text{g/mL}$. As soluções de trabalho apresentavam concentrações de 6,0 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Estas soluções após preparadas e utilizadas foram armazenadas em freezer à -20°C , por até 15 dias.

Equipamentos

Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC) de bomba binária, Nexera SR system (Shimadzu, Japão), com amostrador automático, modelo SIL 30AC (Shimadzu, Japão), acoplado a analisador de massas *Ion trap* (MS/MS - *IonTrap*), modelo amazon X (Bruker, Alemanha/EUA). Foi utilizado ionização por *electrospray* (ESI) no modo positivo para a FFA e no modo negativo para o FF. O *software* utilizado para aquisição e tratamento de dados foi o QuantAnalysis 2.0 (Bruker, Alemanha/EUA).

Foi utilizado um agitador de tubos vortex (DAIGGER-USA) para extração e *clean-up* das amostras e uma centrífuga com refrigeração (Eppendorf, modelo 5810R), para obtenção dos extratos das amostras.

Na evaporação foi utilizado o concentrador de amostras Centrivap (labconco, EUA) e para homogeneização e compartimentalização das amostras, foi utilizado um mini-processador doméstico Walitta, modelo 6440.

Método de determinação do florfenicol na ração medicada

A ração medicada foi analisada por HPLC-FLU, conforme o método validado descrito no Capítulo II desta tese.

Determinação de FF e FFA no músculo de tambaqui

Três gramas de músculo, previamente triturado em mini-processador doméstico, foram pesados em tubos de polipropileno de 50 mL. Foram adicionados 5 mL de solução tampão fosfato (0,1M) pH 7, e 5 mL de ACN. Adicionou-se uma cerâmica que auxilia a homogeneização, levou-se à agitação por 5 minutos e em seguida centrifugação a 5000 x g,

por 5 minutos, a 15 °C. O sobrenadante foi recolhido em outro tubo de polipropileno com capacidade para 50 mL e foi adicionado 10 mL de AcETOH. O tubo foi agitado levemente por 5 minutos, levado à centrífuga 3000 x g por 2 minutos e o AcETOH foi recolhido em outro tubo de 50 mL de polipropileno. À parte aquosa foram adicionados mais 10 mL de AcETOH para uma re-extração. Juntou-se os dois extratos de AcETOH, que foram evaporados até secura total em centrivap à 60 °C. Ao extrato seco, foram adicionados 1 mL de fase móvel e 1 mL de hexano, agitados em vortex por 1 minuto e centrifugados a 3000 x g, por 2 minutos. O hexano foi removido e o extrato foi filtrado em membranas de PVDF com porosidade de 0,22 µm de diâmetro, diretamente no vial, e injetado no sistema HPLC-MS/MS.

O fluxograma do preparo da amostra está apresentado na Figura 2.

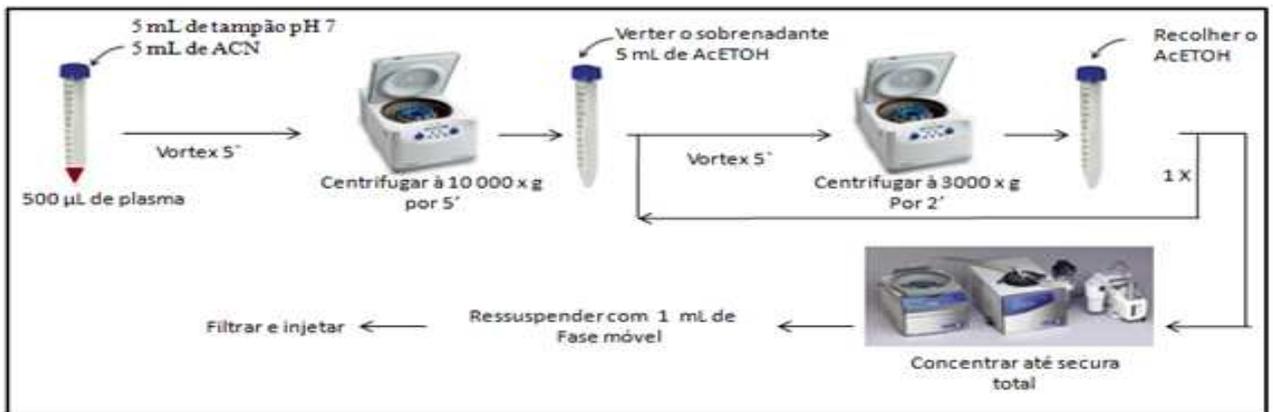


Figura 2. Preparo da amostra para determinação de florfenicol e florfenicol amina em músculo de tambaqui.

Condições do sistema HPLC-MS/MS

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna analítica Xterra RP18 (4.6 x 150 mm, 5µm), Waters. O volume de injeção empregado foi de 10 µL. A fase móvel utilizada foi ácido fórmico 0,1%: ACN (1:1 v/v), em modo isocrático. As massas que foram monitoradas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Fragmentos de massas monitoradas na determinação de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) por espectrometria de massas (HPLC-MS/MS - IonTrap).

	ESI	Íon Molecular protonado	Massa transição (m/z)
FF	(-)	356	336 / 185
FFA	(+)	248	230 / 130

Legenda: ESI – ionização por electrospray

Validação do método analítico

A validação do método baseou-se no guia de validação de métodos analíticos estabelecido pelo MAPA (Brasil, 2011) e pela Comunidade Europeia (EC, 2002), na qual critérios de desempenho para métodos analíticos, destinados a análises de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal, foram estabelecidos.

Os parâmetros de validação avaliados foram: linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão intra e interdias e exatidão. Foram também determinados os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), assim como o limite de decisão ($CC\alpha$) e a capacidade de detecção ($CC\beta$) do método.

Para a realização da validação a fortificação foi realizada com soluções de trabalho nas concentrações de 6,0 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de FF e FFA, respectivamente. Dessa forma, para cada nível de fortificação, diferentes alíquotas foram tomadas para obter a concentração desejada.

A seletividade do método foi avaliada pela análise de 10 amostras branco, verificando nos cromatogramas a ausência de compostos com tempo de retenção igual ao dos analitos de interesse (FF e FFA).

A linearidade e sensibilidade foram estabelecidas a partir de curvas analíticas, obtidas pela análise em triplicata de amostras branco fortificadas com os analitos em 7 níveis de concentração (0,01; 0,025; 0,05; 0,150; 0,250; 0,375; 0,500 $\mu\text{g/g}$), e os resultados foram expressos através de coeficiente de correlação linear (r) e pela inclinação da curva analítica, respectivamente.

A eficiência de extração foi calculada através da comparação das áreas obtidas de amostras branco fortificadas nos níveis de concentração escolhidos, com as áreas obtidas da curva preparada com o extrato fortificado em cada nível de concentração.

O efeito matriz foi avaliado através da extração de amostras branco fortificadas com as soluções de padrão de FF e FFA. O efeito matriz foi avaliado pela comparação estatística

entre as concentrações médias determinadas no extrato fortificado e as concentrações médias dos analitos em solvente, utilizando teste F (Snedecor) para médias iguais e confirmação através de teste t (para amostras diferentes), em amostras que apresentam efeito matriz.

A precisão do método foi determinada através da repetitividade (intradia) e reprodutibilidade (interdia). A repetitividade foi expressa pelo coeficiente de variação (CV %) dos resultados em triplicata. A reprodutibilidade foi expressa pelo CV % dos resultados de três análises, realizadas em três dias diferentes (n=3) pelo mesmo analista e usando o mesmo instrumento.

A exatidão foi avaliada através de testes de recuperação, pela análise de amostras branco fortificadas nos níveis de concentração correspondentes. Os resultados foram expressos em função das concentrações que deveriam ser encontradas (quantidades nominais). A eficiência de extração foi obtida pela relação entre as áreas dos extratos fortificados e matrizes fortificadas, em cada nível de fortificação.

Os LOQ's foram determinados experimentalmente. Foram injetadas diversas concentrações dos analitos, em 10 replicatas cada, e a concentração aceita foi aquela com coeficiente de variação (CV%) menor que 35%, conforme recomendação do MAPA (Brasil, 2011), para concentrações menores que $1\mu\text{g/g}$. O limite de detecção foi determinado através da relação sinal ruído da linha de base na proporção 3 vezes a área do sinal em relação ao ruído da linha de base, conforme descrito por Paschoal et al. (2008).

Preparo da ração medicada

A ração medicada administrada aos peixes foi preparada conforme descrito no Capítulo II desta tese, porém na concentração de 10 mg/kg pv.

Peixes e condições experimentais

Foram utilizados 144 tambaquis ($280\text{ g} \pm 87\text{ g}$), obtidos de fazendas comerciais, que não tinham recebido tratamento com FF (Aquaflor), os quais foram transferidos para o Laboratório de Piscicultura da EMBRAPA Amazônia Ocidental, Manaus AM. Os peixes foram aclimatados por 7 dias, em tanques-rede de dimensão 1,2 x 1,2 x 1,5 m. A temperatura da água, pH, e oxigênio dissolvido foram de $31,1 \pm 1,3\text{ }^\circ\text{C}$, $7,3 \pm 0,7$ e $6,6 \pm 2,4$, respectivamente. Cento e vinte peixes com peso médio de $279,5 \pm 11,2\text{ g}$ receberam, por via oral, a dose nominal de 10 mg de FF/kg de pv (equivalente a 20 mg de Aquaflor/kg de pv), que foi veiculada através da ração administrada aos peixes, no período da manhã, por 10 dias

consecutivos. Em outro tanque, 24 peixes receberam ração comercial isenta do antimicrobiano e serviram como branco ou controle negativo. Para coleta do músculo, os peixes foram submersos em banho de gelo e abatidos por secção medular. As amostras foram coletadas em 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 10; 14; 16; 21; 28 dias após a administração da ração medicada. As amostras foram armazenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e enviadas ao laboratório de Toxicologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, SP, para realização da determinação dos resíduos de FF e FFA. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (3642-1) (ANEXO I).

Resultados e Discussão

Otimização do preparo da amostra

O FF e a FFA são moléculas estruturalmente parecidas, porém com características químicas muito diferentes. A FFA é uma molécula altamente polar com elevada afinidade pela água, interagindo muito pouco com colunas analíticas de fase reversa, sejam elas C18 ou ainda C8. Sua retenção na coluna analítica utilizada aqui neste trabalho foi de 2,5 minutos. O FF apresentou uma polaridade intermediária, e com maior tempo de retenção na coluna analítica, sendo necessário aumentar a concentração da fase orgânica da fase móvel para que houvesse eluição de sua molécula, o tempo de retenção foi de 4,5 minutos (Figura 3).

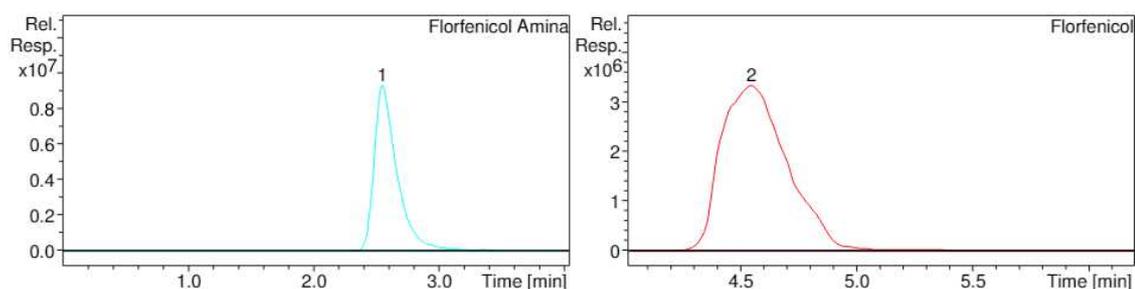


Figura 3. Cromatograma típico de FFA e FF na concentração de $1\text{ }\mu\text{g/g}$ em ACN, em coluna Xterra Rp18 de $5\mu\text{m}$ ($4.6\times 150\text{ mm}$).

O tempo de retenção para a FFA foi muito semelhante, indiferentemente à composição da fase móvel. A cada teste de composição da fase móvel, verificava-se que quanto maior a fase aquosa, mais largo era seu pico que se iniciava muito próximo ao tempo morto e, em

direção oposta o FF ficava mais retido na coluna, aumentando muito o tempo total da corrida analítica. Assim, a composição da fase móvel escolhida neste trabalho foi determinada com base no tempo de corrida, consumo de solvente e no cálculo dos parâmetros cromatográficos segundo Paschoal et al. (2008). Os resultados obtidos demonstraram a conformidade do sistema cromatográfico para determinação de FF e de FFA (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros cromatográficos de conformidade do sistema cromatográfico obtidos para florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA).

Parâmetro	FF	FFA
Fator de retenção (k)	8,2	4,2
Fator de separação (α)	1,8	
Resolução (Rs)	2,4	
Números de pratos (N)	52,2	150,0
Altura equivalente à um prato (H)	0,3	0,1
Fator de assimetria (As)	1,5	1,5
Fator de alargamento (TF)	1,7	1,2

Para a extração do FF e da FFA, do músculo do tambaqui, as diferenças químicas também foram observadas. O FF, que apresenta pka 9,03 (Zhao & Ball, 2009), é facilmente extraído, e apresenta boa recuperação, utilizando solventes de média polaridade como ACN, metanol e AcETOH. Porém, a FFA, que apresenta pka 7,38 (Alechaga et al, 2012), apresentou recuperação muito baixa quando se utilizou apenas solventes (ACN, metanol, AcETOH, acetona, clorofórmio, hexano e água). Para todos os solventes testados não se obteve mais de 10% de recuperação da FFA. Sendo assim foram testadas como solução extratora, soluções tampão em 6 níveis de pH (3, 4, 5, 6, 7 e 8) utilizando, para tanto, tampão McIlvaine (ácido cítrico 0,1 mM / fosfato de sódio 0,1 mM). O melhor resultado de recuperação para FFA foi obtido em pH 7, mesmo que ainda baixo para ambos analitos (FF e FFA) (Figura 4). Apesar do baixo resultado obtido para recuperação, dentre todos os testes realizados, esse foi o mais promissor. Assim prosseguiu-se com tampão pH 7 tendo sido testados diferentes volumes de acetonitrila, volume da solução extratora e re-extrações repetidas. A adição de acetonitrila na solução extratora, tempo de agitação de 5 minutos e a re-extração, possibilitou aumento significativo das recuperações, chegando-se ao procedimento de preparo da amostra apresentado na Figura 2. Para ambos os analitos, recuperação atendeu às recomendações do guia de validação (MAPA, 2011), que recomenda que em concentrações menores que 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a recuperação deve ser entre 50 e 120%.

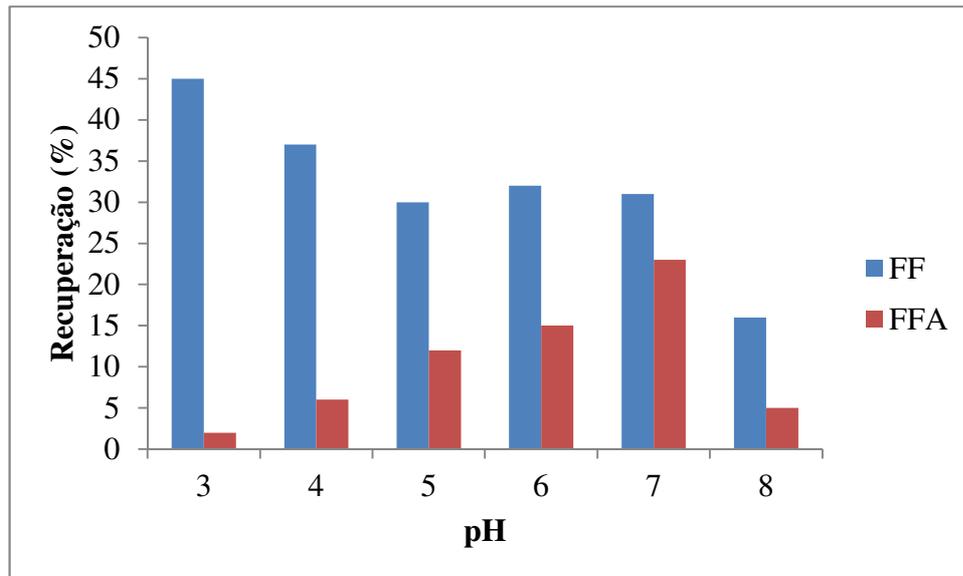


Figura 4. Recuperação do florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA), utilizando 5 g de amostra e 5 mL de solução tampão McIlvaine, em diferentes pHs.

Na literatura são relatados diversos métodos para extração de FF em músculo de pescado (Lewbart et al., 2005; Gaikowski et al., 2010; Lim et al., 2010; Zhao et al., 2011; Feng et al., 2008; Feng et al., 2009; Sun et al., 2010). Também são encontrados diversos métodos para extração de FFA em músculo de pescado em que se realiza hidrólise ácida do FF e se analisa somente a FFA (Wrzesinski et al., 2003; Wrzesinski et al., 2006; Salvo et al., 2013; Kosoff et al., 2013; Gaikowski et al., 2010). Contudo, apenas um método foi encontrado em que se determina simultaneamente FF e FFA, Xie et al., 2012, porém os autores utilizaram diversas extrações, vários solventes (acetona, diclorometano, acetonitrila, hexano) e realizaram o *clean-up* com auxílio de cartuchos de extração em fase sólida (SPE) se apresentando, portanto, como um método muito dispendioso e laborioso.

O método desenvolvido no presente estudo apresenta como principais vantagens ser de fácil execução e baixo custo.

Validação do método analítico para determinação de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) no músculo

Os parâmetros obtidos na validação do método analítico para a determinação de FF e FFA em músculo de tambaqui são apresentados na Tabela 3.

A seletividade foi avaliada pela comparação entre os cromatogramas obtidos na análise de amostras branco e amostras branco fortificadas. Conforme pode ser observado na

Figura 5, não foram verificados compostos com o mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse (FFA, FF) indicando que o método foi seletivo.

Verificou-se que há efeito matriz para o FF e FFA no músculo de tambaqui, pela comparação da curva no solvente com a curva no extrato. Portanto, a quantificação das amostras foi realizada na curva matrizada, que apresentou linearidade na faixa de 0,010 a 0,500 $\mu\text{g/g}$ para o FF e 0,015 a 0,500 $\mu\text{g/g}$ para a FFA (Figura 6).

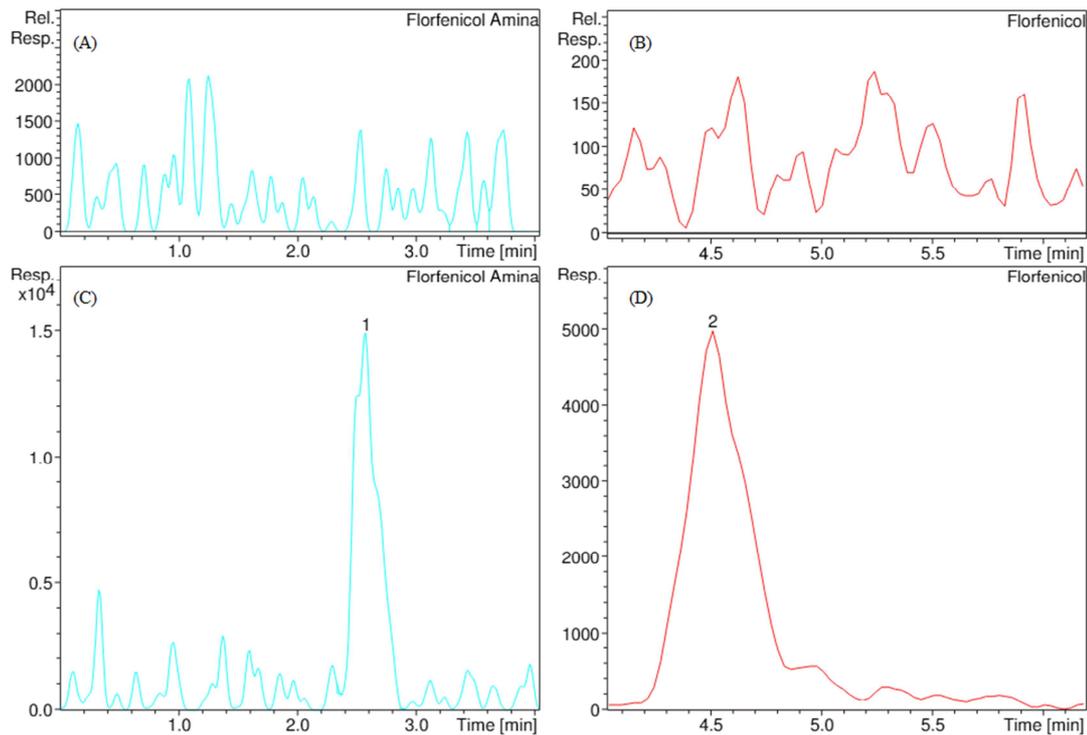


Figura 5. Cromatogramas da matriz de músculo de tambaqui isenta (branco) de FFA (A) e FF (B) e matriz branco fortificada com FFA (C) e FF (D) na concentração do LOQ ($\mu\text{g/mL}$).

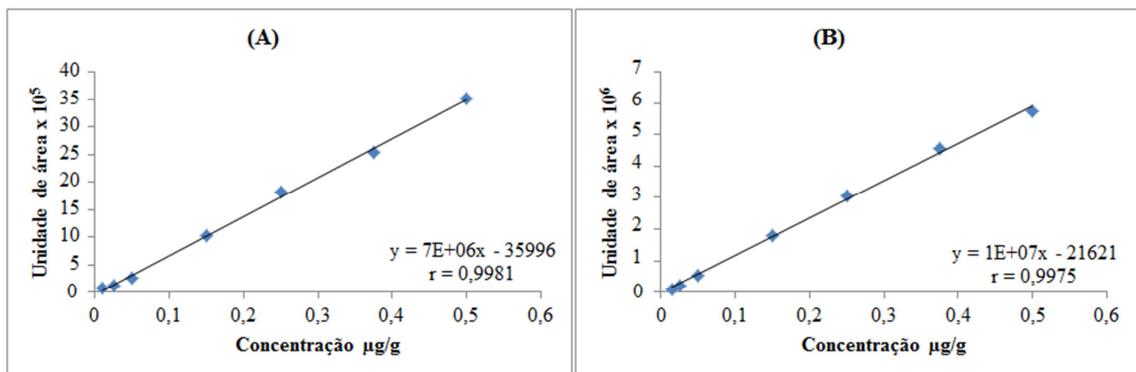


Figura 6. Curvas analíticas matrizadas do FF (A) e FFA (B), em músculo de tambaqui (*Collossoma macropomum*).

Tabela 3. Parâmetros de validação do método analítico para determinação de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) em músculo de tambaqui.

Parâmetros	FF	FFA
LOD ($\mu\text{g/g}$)	0,005	0,008
LOQ ($\mu\text{g/g}$)	0,010	0,015
Exatidão (%)		
LOQ	87	67
0,025 ($\mu\text{g/g}$)	81	65
0,050 ($\mu\text{g/g}$)	89	56
0,150 ($\mu\text{g/g}$)	96	61
0,250 ($\mu\text{g/g}$)	92	64
0,375 ($\mu\text{g/g}$)	81	60
0,500 ($\mu\text{g/g}$)	86	60
Precisão (CV%) Intradia		
LOQ	21,6	23,8
0,250 ($\mu\text{g/g}$)	11,2	13,4
0,500 ($\mu\text{g/g}$)	15,0	18,7
Precisão (CV%) Interdia		
LOQ	28,5	26,9
0,250 ($\mu\text{g/g}$)	20,1	23,7
0,500 ($\mu\text{g/g}$)	23,9	21,5
Efeito Matriz (%)		
LOQ	14	43
0,025 ($\mu\text{g/g}$)	23	38
0,050 ($\mu\text{g/g}$)	22	44
0,150 ($\mu\text{g/g}$)	17	34
0,250 ($\mu\text{g/g}$)	22	32
0,375 ($\mu\text{g/g}$)	14	32
0,500 ($\mu\text{g/g}$)	11	34

Legenda: LOD – limite de detecção; LOQ – limite de quantificação; CV – coeficiente de variação.

A indisponibilidade de um material de referência certificado, para determinação da exatidão de FF e FFA em músculo de tambaqui, levou à necessidade da aplicação do teste de recuperação para obtenção deste parâmetro. Desta forma, realizou-se ensaio de recuperação para avaliar a exatidão.

A recuperação obtida para o FF variou entre 81 - 96%, indicando o bom desempenho do método desenvolvido. A FFA apresentou baixa recuperação, 56 – 67%, como explicado anteriormente.

As precisões intradia (repetibilidade) e interdias (reprodutibilidade) foram expressas como CV dos resultados obtidos com amostras fortificadas em triplicata, analisadas em condições de repetitividade intra e interdias. Os resultados obtidos (Tabela 3) atendem os Guias de Validação da Comunidade Europeia (EC, 2002) e do MAPA (Brasil, 2011) que recomendam que, em condições de reprodutibilidade intralaboratorial, o valor de CV não deve exceder 35% para concentrações do analito menores que 1 µg/mL.

O LOD e o LOQ do método foram de 0,005 e 0,010 µg/g para o FF e de 0,008 e 0,015 µg/mL para a FFA. Amostras branco (n=10) foram fortificadas com FF e FFA no nível do LOQ e analisadas. O valor máximo de CV para os resultados obtidos no LOQ, 26,7 e 28,3% para FF e FFA respectivamente, corrobora a boa repetibilidade do método, e atende o Guia de Validação do MAPA (Brasil, 2011), que estabelece que valores de CV não devem ser maiores que 35% para concentrações do analito menores que 1 µg/mL.

Análise da ração utilizada no ensaio de depleção

Utilizando o método desenvolvido e validado previamente descrito (capítulo II desta tese), a ração utilizada no ensaio de depleção foi analisada em triplicata.

A concentração nominal de FF adicionado na ração foi de 660 mg/kg de ração, a qual foi preparada segundo recomendação da bula do medicamento (Schering-Plough, 2015). Entretanto, a concentração de FF determinada na ração medicada pelo método analítico foi de 567,0 mg/kg de ração. Sendo assim, a quantidade administrada de ração medicada aos peixes foi acrescida em 15%, para certificação da dose real administrada (10 mg/kg de pv).

Depleção de resíduos de florfenicol (FF) no músculo

O presente estudo foi realizado com temperatura média de 31,1 °C, que é típica para a região amazônica do Brasil, região esta que responde pela maior produção nacional de tambaqui (MPA, 2010). Na piscicultura brasileira, segundo dados do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, do Centro de Aquicultura da UNESP – Caunesp, as enfermidades bacterianas de maior ocorrência, principalmente na tilápia, pacu e tambaqui, são as causadas pela *Flavobacterium columnare* (52,4%), *Aeromonas hydrophila* (32,8%) e *Streptococcus* sp (14,8%). O tratamento dessas doenças depende da administração de medicamentos veterinários.

Os resultados encontrados no presente trabalho estão apresentados na Tabela 4 e Figura 7. Verifica-se que após 4 dias da última administração da ração medicada, não foram

encontrados resíduos quantificáveis de FF. Para a FFA, este período foi menor ainda, de apenas 2 dias após a última administração. Estudos de depleção de resíduos realizados em tilápia híbrida demonstraram que nas primeiras 24 horas após a última administração da ração medicada, os resíduos no músculo da somatória de FF e FFA, expressos como FF, já se encontravam abaixo do LMR de 1000 µg/kg (Schering Plough, 2015). Para tilápias-do-Nilo, esse resultado foi verificado após 48 horas. Apesar disso, o período de carência recomendado pela bula do medicamento veterinário é de 14 dias. A empresa justifica que segue a recomendação do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, que recomenda que a administração de medicamentos veterinários deva ser suspensa 14 dias antes do abate (Schering-Plough, 2014).

Tabela 4. Concentração de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA) em músculo de tambaqui (n=10) após administração via oral através de ração medicada, de 10 mg de FF/kg de peso vivo, durante 10 dias.

Tempo (dias)	FF	FFA
	(µg/g)	(µg/g)
1	0,137 ± 0,033	0,101 ± 0,032
2	0,104 ± 0,024	0,019 ± 0,004
3	0,056 ± 0,025	< LOD
4	0,032 ± 0,011	< LOD
5	< LOD	< LOD
6	< LOD	< LOD

Legenda:LOQ – limite de quantificação.

Para melhor visualização dos resultados, na Figura 7 é apresentado gráfico de depleção da somatória dos resíduos de FF e FFA. Verifica-se que na primeira coleta realizada, os resíduos já se encontram em concentração menor que o LMR permitido de 1000 µg/kg (Regulamento CEE N° 2377/90; EC, 1990; FDA, 2015; Brasil, 2012). Resultado semelhante foi obtido por Feng et al. (2008) e Feng et al. (2009), após administrar, por via oral, FF em dose única de 10 mg/kg de pv, em tilápias (*Oreochromis niloticus* e *O. aureus*). A temperatura média do experimento realizado por esses autores foi de 22 e 28 °C.

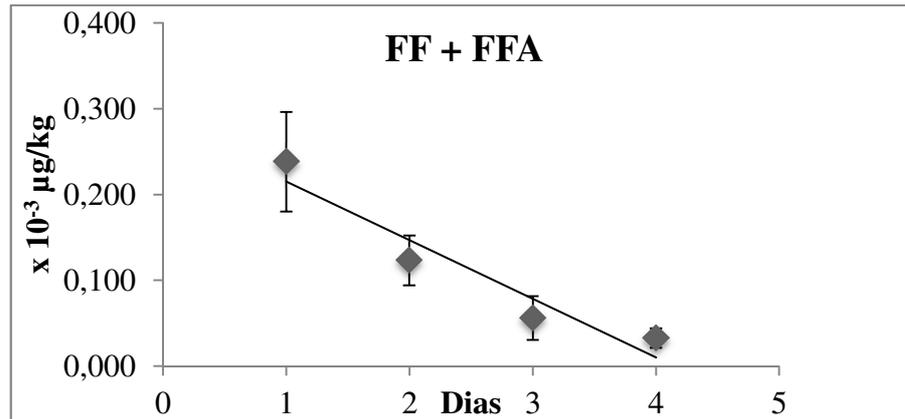


Figura 7. Concentração da somatória de florfenicol (FF) e florfenicol amina (FFA), após administração de FF por via oral, através de ração medicada (10 mg/kg peso vivo), por 10 dias, em tambaqui (*Colossoma macropomum*) (n=10).

Alguns artigos são encontrados na literatura com estudos sobre a depleção de resíduos de FF em pescado após administração oral. Wrzesinski et al. (2006) após administração via oral (ração) de 9,3 mg de FF/kg de pv, por 12 dias, em peixe bagre de canal e truta, encontraram resíduos acima do LMR durante 3 dias após a última administração da ração medicada. A temperatura do experimento foi de 20,7 °C. Salvo et al. (2013) após administração oral de 20 mg de FF/kg de pv, por 10 dias, em truta e pargo, verificaram a presença de resíduos acima do LMR, 2 e 3 dias após a última administração da ração medicada, para cada espécie, respectivamente. Vale ressaltar que a temperatura média dos experimentos foi de 27,4 °C e a água era 28% salinizada. Gaikowski et al. (2010) após administração oral, de 15 mg de FF/kg de pv, por 12 dias, em tilápia híbrida e tilapia-do-Nilo, encontraram resíduos acima do LMR, 1 e 2 dias após a última administração da ração medicada, para cada espécie, respectivamente. Vale ressaltar que a temperatura média dos experimentos foi de 25 - 27 °C.

Com base nos artigos mais relevantes encontrados na literatura, pode-se verificar que o período de carência do FF não é muito longo para pescado. Verifica-se ainda que a FFA é um metabólito do FF, assim como também foi encontrado neste trabalho.

Conclusões

O método analítico validado para a determinação dos níveis residuais de FF e FFA em músculo de tambaqui foi adequado para o fim pretendido. Os parâmetros de validação avaliados demonstraram conformidade com os guias de validação do MAPA (Brasil, 2011) e da Comunidade Europeia (EC, 2002).

Os resultados obtidos mostram que em tambaqui o período de carência do FF, administrado ao longo de 10 dias, por via oral através da ração, na dose de 10 mg/kg pv, é menor do que 1 dia.

Referências Bibliográficas

- Alechaga, E.; Moyano, E.; Galceran, M.T. Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of phenicol drugs and florfenicol-amine in foods. *Analyst*, v. 137, p. 2486–2494, 2012.
- Brasil, 2010. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Boletim estatístico da pesca e aquicultura. Disponível em <http://www.uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2013/luis_art4_rousseff.pdf>. Acessado em 23.04.2013.
- Brasil, 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Guia%20de%20valida%C3%A7%C3%A3o%20e%20controle%20de%20qualidade%20analitica.pdf> . Acessado em 30.05.2013.
- Brasil, 2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº11, DE 22 DE MAIO DE 2012. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2011-2012%20-%20Publica%C3%A7%C3%A3o%20PNCRC%202012%20em%2022-05-2012.pdf>. Acessado em 04.06.2013.
- Brasil, 2014. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano Nacional de Controle de Resíduos, Instrução normativa SDA nº 11, de 07 de maio de 2014. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2011%20-%20PNCRB%202014.pdf> . Acessado em 21.09.2014.

- EC, 1990. European Commission. Commission Regulation n° 1181/2002 of 1 July 2002, amending Annex I of Council Regulation (EEC) no 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Disponível em <http://ec.europa.eu/health/files/mrl/regpdf/2002_07_01-1181_en.pdf>. Acessado em 27.02.2015.
- EC, 2002. European Commission. Official Journal of the European Communities, 17/08/2002, L221/8-36. Disponível em <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/vet_mrl_search.jsp&murl=menus/regulations/regulations.jsp&mid=WC0b01ac058006488e>. Acessado em 23.03.2014.
- Feng, J.B.; Jia, X. P.; Li, L.D. Tissue distribution and elimination of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) after a single oral administration in freshwater and seawater at 28 °C. **Aquaculture**, v. 276, p. 29-35, 2008.
- Feng, J.B.; Jia X.P. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) held in freshwater at 22 °C. **Aquaculture**, v. 289, p. 129-133, 2009.
- FDA, 2015. Food and Drug Administration. Disponível em <<http://www.mrlatabase.com/results.cfm>>. Acessado em 20.05.2013.
- Gaikowski, M.; Mushtaq, M.; Cassidy, P.; Meinertz, J.R.; Schleis, S.M.; Sweeney, D.; Endris, R.G. Depletion of Florfenicol amine, marker residue Florfenicol, from the edible fillet of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. niloticus* and *O. niloticus* × *O. aureus*) following Florfenicol administration feed. **Aquaculture**, v. 301, p. 1-6, 2010.
- Graham, R.; Palmer, D.; Pratt, B.C.; Hart, C.A. In vitro activity of florfenicol. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 691–694, 1988.
- Kosoff, R.E.; Chen, C.; Wooster, Y.G.A.; Getchell, R.G.; Bowser, P.R.; Clifford, A.; Craig, J.L.; Lim, P.; Wetzlich, S.E.; Craigmill, A.L.B.; Tell, L.A. Florfenicol Residues in Three Species of Fish after 10-Day Oral Dosing in Feed. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 21, n. 1, p. 8-13, 2013.

- Lewbart, G.A.; Papich, M.G.; Whitt-Smith, D. Pharmacokinetics of florfenicol in the red pacu (*Piaractus brachypomus*) after single dose intramuscular administration. **Journal of veterinary Pharmacology Therapeutics**, v. 28, p. 317–319, 2005.
- Lim, J.H.; Kim, M.S.; Hwang, Y.H.; Song, I.B.; Park, B.K.; Yun, H.I. Plasma and tissue depletion of florfenicol in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration. **Aquaculture**, v. 307, p. 71-74, 2010.
- Malta, J.C.O.; Gomes, A.L.S.; Andrade, S.M.S. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia central. **Acta Amazonica**, v. 31, p.133-143, 2001.
- MAPA, 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Guia%20de%20valida%C3%A7%C3%A3o%20e%20controle%20de%20qualidade%20analitica.pdf> . Acessado em 30.05.2013.
- MAPA, 2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº11, DE 22 DE MAIO DE 2012. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2011-2012%20-%20Publica%C3%A7%C3%A3o%20PNCRC%202012%20em%2022-05-2012.pdf>. Acessado em 04.06.2013.
- MAPA, 2014. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano Nacional de Controle de Resíduos, Instrução normativa SDA nº 11, de 07 de maio de 2014. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2011%20-%20PNCRB%202014.pdf> . Acessado em 21.09.2014.
- MPA, 2010. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Boletim estatístico da pesca e aquicultura. Disponível em <http://www.uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2013/luis_art4_rousseff.pdf>. Acessado em 23.04.04.2013.
- Park, B.K.; Lim, J.H.; Kim, M.S.; Yun, H.I. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in the Korean catfish (*Silurus asotus*). **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**, v. 29, p. 37–40, 2006.

- Paschoal, J.A.R.; Rath, S.; Airoidi, F.P.S.; Reyes, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Quimica Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.
- Salvo, A. D.; Della Rocca, G.; Terzetti, E.; Malvisi J. Florfenicol depletion in edible tissue of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and sea bream, *Sparus aurata* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, n. 8, p. 685-93, 2013.
- Silva, C.M.A. 2001. Bactérias gram-negativas isoladas do tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) criado em cativeiro, Amazonas-Brasil. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 66 pp.
- Schering-Plough, 2014. Boletim técnico: Período de retirada do Aquaflor® 50% Premix em filés de Tilápias. Disponível em <http://www.nmaquicultura.com.br/uploads/artigo_arquivo/boletimresidualidadefiletilapia.pdf>. Acessado em 16.09.2014.
- Sun, Y.X.; Zhao, H.Y.; Shi Zhu, Q.S.; Zeng, D.P.; Liu, Z.C. Tissue distribution and elimination of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus cuvieri*) after a single dose intramuscular or oral administration. **Aquaculture**, v. 309, p. 82–85, 2010.
- Wrzesinski, C.L., Crouch L.S. Determination of Florfenicol Amine in Channel Catfish Muscle by Liquid Chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 86, n.3, p. 515-535, 2003.
- Wrzesinski, C.; Crouch, L.; Gaunt, P.; Holifield, D.; Bertrand, N.; Endris, R. Florfenicol residue depletion in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Aquaculture**, v. 253, p. 309-316, 2006.
- Xie , L.L.; Wu, Z.X.; Chen, X.X.; Li, Q.; Yuan, J.; Liu, H.; Yang, Y. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in rice field eel (*Monopterus albus*) after a single-dose intramuscular or oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 36, p. 229-35, 2012.
- Zhao, L.; Ball, C.H. (2009). Determination of Chloramphenicol, Florfenicol, and Thiamphenicol in Honey Using Agilent SampliQ OPT Solid-Phase Extraction Cartridges and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Application Note of

Agilent Technologies. Disponível em
<<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-3615EN.pdf>>. Acessado em
21.01.2015.

Zhao, H.Y.; Zhang, G.H.; Bai, L.; Zhu, S.; Shan, Q.; Zeng, D.P.; Sun, Y.X. Pharmacokinetics of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus cuvieri*) after a single intramuscular or oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, p. 460-463, 2011.

Discussão Geral

Na literatura são relatados artigos sobre farmacocinética de FF com diferentes espécies de peixes (*Ictalurus punctatus*, *Solurus asotus*, *Carassius auratus cuvieri*, *Monopterus albus*, *Paralichthys olivaceus*, *Piaractus brachypomus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Pagrus pagrus*, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus*), e diferentes doses de tratamento (5 a 40 mg de FF/kg pv), diferentes vias de administração (via oral, intramuscular e endovenosa) e em diferentes condições ambientais (temperatura, salinidade e pH) (Feng et al., 2008; Feng et al., 2009; Gaikowski et al., 2009; Lewbart et al., 2005; Lim et al., 2010; Park et al., 2006; Salvo et al., 2013; Wrzesinski et al., 2006; Xie et al., 2012; Zhao et al., 2010). As variáveis acima mencionadas, acopladas à variabilidade intra-espécie, afetam significativamente os parâmetros farmacocinéticos e precisam efetivamente ser levados em consideração, uma vez que a diversidade de resultados relatados pelos autores, como por exemplo, a concentração máxima de FF encontrada no plasma, que variou de 1,09 a 29,32 µg/mL.

Estudos de dose única com FF foram realizados em várias espécies de peixes e, principalmente, com tilápias e trutas. No entanto, não há estudos com espécies amazônicas, que permitam uma comparação mais próxima com a espécie estudada neste trabalho. O tambaqui requer temperatura elevada (26 - 32°C) para ótimo desenvolvimento, e alimentação frugívora e onívora, características essas que precisam ser levadas em consideração na avaliação da absorção de fármacos.

A concentração máxima encontrada neste trabalho, quando se administrou 21,0 mg de FF/kg de pv, em dose única, foi de 2,426 e 1,552 µg/mL, para o FF e seu metabólito, a FFA, respectivamente. O tempo necessário para atingir esta concentração máxima do FF e seu metabólito foi de 12 horas.

Hosberg et al. (1994), estudaram a distribuição de ¹⁴C-FF nos tecidos, por radioatividade e também por análise cromatográfica (HPLC-UV), e relataram uma rápida biotransformação do FF, com rápido decaimento no sangue e no músculo e lento no rim e no olho de salmão do atlântico, após administração via oral de 10 mg de FF/kg de pv.

Em nosso estudo, a concentração de FF e FFA após a C_{max}, 12 horas após a administração do FF, diminuiu rapidamente, com meia-vida de 32,4 horas para o FF e 21,4 horas para o FFA, sendo que nos tempos de coleta a partir de 144 h, a concentração de FFA no plasma esteve abaixo do LOQ do método analítico (0,05 µg/mL) não sendo, portanto, possível a sua quantificação.

A FFA é o metabólito mais importante na administração de FF em bovinos (Sams, 1994), aves (Anadón, 2008), suínos (Jiancheng et al., 2006), cães (Park et al., 2008) e também em peixes (Gaikowski et al., 2010; Hosberg, 1994; Hormazabal et al., 1993). Sabe-se que a FFA é considerada internacionalmente um resíduo marcador do FF.

Os resultados obtidos neste trabalho, expressos através dos parâmetros farmacocinéticos foram significativamente menores aos já relatados por outros autores. Park et al. (2006) administraram, por via oral, 20 mg de FF/kg de pv, em Bagre (*Silurus asotus*). As $C_{máx}$ e $t_{máx}$ encontradas foram de 13,19 $\mu\text{g/mL}$ e 8 horas, respectivamente, resultado 70% maior do que a $C_{máx}$ verificada no presente estudo. Vale ressaltar que a temperatura de desenvolvimento do experimento realizado por esses autores foi de 23°C, sendo o tempo de residência de fármacos é maior em temperaturas mais baixas. Lim et al. (2010) também administraram 20 mg de FF/kg de pv, porém em Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) e por via intramuscular. As $C_{máx}$ e $t_{máx}$ encontradas por esses autores foram de 12,81 $\mu\text{g/mL}$ e 4 horas, respectivamente, resultado 69% maior do que a concentração verificada neste trabalho. A temperatura de desenvolvimento do experimento, nesse trabalho citado, foi de 18,5°C.

A $C_{máx}$ observada no presente estudo, menor do que a de outros estudos explicita uma rápida absorção e eliminação ou ainda uma baixa absorção, deste fármaco no plasma de tambaqui. Verifica-se a influência do metabolismo e da temperatura mais elevada, no favorecimento da eliminação do FF. Esse resultado é de extrema importância na previsão de resultados clínicos para o tratamento de bacterioses.

Para o tratamento de bacterioses, a eficiência de um fármaco está diretamente ligada à sua capacidade de alcançar e manter a concentração no local da infecção, e neste estudo, o fármaco foi disponibilizado por via oral para atingir o local de infecção (músculo). Sendo assim, o plasma possui um papel importante na transferência para o tecido alvo.

Os fármacos apresentam uma concentração mínima inibitória (MIC) para impedir o desenvolvimento das bactérias alvo. Essa é a medida para o cálculo da dosagem e tratamento de enfermidades, conforme sugerem Shojaee Aliabadi & Lees (2000), que alertam que a MIC deve ser mantida no tecido alvo durante todo o tratamento.

Yanong et al. (2005), relataram MIC's para o FF em *Streptococcus* sp e *Aeromonas* sp. Para tanto, foram avaliadas seis cepas de *Streptococcus* sp e três cepas de *Aeromonas* sp. Os MIC's determinados variaram entre ≤ 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$. Comparando estes valores com os valores encontrados no presente estudo, verifica-se que após a administração por via oral de 21,0 mg de FF por kg de pv, a $C_{máx}$ obtida em 12 horas, atinge essa concentração inibitória no

plasma, sendo necessário verificar a concentração atingida no músculo, que é o local alvo das bactérias, e onde precisa ser atingida essa concentração.

Gaunt et al. (2011) apresentaram valores de MIC's para FF em bactérias obtidas da criação de bagres e tilápias. Para *Edwardsiella ictaluri* a MIC encontrada foi de 0,25 µg/mL, para *Flavobacterium columnare* de 0,5 – 1,0 µg/mL, para *Streptococcus iniae* e *Streptococcus agalactiae* de 2,0 – 4,0 µg/mL, e para *Aeromonas hydrophila* de 0,5 – 4,0 µg/mL. Segundo estes valores, a concentração máxima de FF encontrada no plasma, no presente trabalho, atinge essa concentração inibitória necessária para controlar a bacteriose, porém o músculo é o alvo dessas bactérias, precisando então ser avaliada a concentração neste tecido para eficácia no tratamento dessas bactérias.

O presente estudo foi realizado com temperatura média de 31,1 °C, que é típica para a região amazônica do Brasil, região esta que responde pela maior produção nacional de tambaqui (MPA, 2010). Na piscicultura brasileira, segundo dados do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, do Centro de Aquicultura da UNESP – Caunesp, as enfermidades bacterianas de maior ocorrência, principalmente na tilápia, pacu e tambaqui, são as causadas pela *Flavobacterium columnare* (52,4%), *Aeromonas hydrophila* (32,8%) e *Streptococcus* sp (14,8%). O tratamento dessas doenças depende da administração de medicamentos veterinários.

Pelos resultados encontrados no presente trabalho, verifica-se que após 4 dias da última administração da ração medicada, não foram encontrados resíduos quantificáveis de FF. Para a FFA, este período foi menor ainda, de apenas 2 dias após a última administração. Estudos de depleção de resíduos realizados em tilápia híbrida demonstraram que nas primeiras 24 horas após a última administração da ração medicada, os resíduos no músculo da somatória de FF e FFA, expressos como FF, já se encontravam abaixo do LMR de 1000 µg/kg (Schering Plough, 2015). Para tilápias-do-Nilo, esse resultado foi verificado após 48 horas. Apesar disso, o período de carência recomendado pela bula do medicamento veterinário é de 14 dias. A empresa justifica que segue a recomendação do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, que recomenda que a administração de medicamentos veterinários deva ser suspensa 14 dias antes do abate (Schering-Plough, 2014).

No presente trabalho, verificou-se que na primeira coleta realizada, os resíduos já se encontram em concentração menor que o LMR permitido de 1000 µg/kg (Regulamento CEE Nº 2377/90; EC, 1990; FDA, 2015; Brasil, 2012). Resultado semelhante foi obtido por Feng et al. (2008) e Feng et al. (2009), após administrar, por via oral, FF em dose única de 10

mg/kg de pv, em tilápias (*Oreochromis niloticus* e *O. aureus*). A temperatura média do experimento realizado por esses autores foi de 22 e 28 °C.

Alguns artigos são encontrados na literatura com estudos sobre a depleção de resíduos de FF em pescado após administração oral. Wrzesinski et al. (2006) após administração via oral (ração) de 9,3 mg de FF/kg de pv, por 12 dias, em peixe bagre de canal e truta, encontraram resíduos acima do LMR durante 3 dias após a última administração da ração medicada. A temperatura do experimento foi de 20,7 °C. Salvo et al. (2013) após administração oral de 20 mg de FF/kg de pv, por 10 dias, em truta e pargo, verificaram a presença de resíduos acima do LMR, 2 e 3 dias após a última administração da ração medicada, para cada espécie, respectivamente. Vale ressaltar que a temperatura média dos experimentos foi de 27,4 °C e a água era 28% salinizada. Gaikowski et al. (2010) após administração oral, de 15 mg de FF/kg de pv, por 12 dias, em tilápia híbrida e tilapia-do-Nilo, encontraram resíduos acima do LMR, 1 e 2 dias após a última administração da ração medicada, para cada espécie, respectivamente. Vale ressaltar que a temperatura média dos experimentos foi de 25 - 27 °C.

Com base nos artigos mais relevantes encontrados na literatura, pode-se verificar que o período de carência do FF não é muito longo para pescado. Verifica-se ainda que a FFA é um metabólito do FF, assim como também foi encontrado neste trabalho.

Referências Bibliográficas

- Anadón, A.; Martínéz, M.A.; Martínéz, M.; Ríos, A.; Caballero, V.; Ares I.; Martínéz-Larrañaga, M.R. Plasma and Tissue Depletion of Florfenicol and Florfenicol-amine in Chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 11049-11056, 2008.
- Brasil, 2012. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2011-2012%20-%20Publica%C3%A7%C3%A3o%20PNCRC%202012%20em%2022-05-2012.pdf>. Acessado em 08.06.2015.
- EC, 1990. European Commission. Commission Regulation n° 1181/2002 of 1 July 2002, amending Annex I of Council Regulation (EEC) no 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Disponível em <http://ec.europa.eu/health/files/mrl/regpdf/2002_07_01-1181_en.pdf>. Acessado em 27.02.2015.

- FDA, 2015. Food and Drug Administration. Disponível em <<http://www.mrlatabase.com/results.cfm>>. Acessado em 20.05.2013.
- Feng, J.B.; Jia, X.P.; Li, L.D. Tissue distribution and elimination of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. caureus*) after a single oral administration in freshwater and seawater at 28 °C. **Aquaculture**, v. 276, p. 29-35, 2008.
- Feng, J.B.; Jia X.P. Single dose pharmacokinetic study of flofenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) held in freshwater at 22 °C. **Aquaculture**, v. 289, p. 129-133, 2009.
- Gaikowski, M.P; Mushtaq, M.; Cassidy, P.; Meinertz, J.R; Schleis, S.M.; Sweeney, D.; Endris, R.G. Depletion of Florfenicol amine, marker residue Florfenicol, from the edible fillet of tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. niloticus* and *O. niloticus* x *O aureus*) following Florfenicol administration feed. **Aquaculture**, v. 301, p. 1-6, 2010.
- Gaunt, P.S.; Langston C.; Wrzesinski C.; Gao D.; Adams P.; Crouch L; Sweeney D.; Endris R. Single intravenous and oral dose pharmacokinetics of florfenicol in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of Veterinary Pharmacology and therapeutics**, v. 35, p. 503–507, 2011.
- Hormazabal, V.; Steffenak, I.; Yndestad, M. Simultaneous determination of residues of florfenicol and florfenicol amine in fish tissues by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 616, p. 161-165, 1993.
- Horsberg, T.E.; Martinsen, B.; Varma, K.J. The disposition of ¹⁴C-florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 122, p. 97-106, 1994.
- Jiancheng, L.; Shuangyang, D.; Suxia, Z.; Cun, L.; Xiaowei, L.; Zhongwei, L.; Jianzhong, S. Residue Depletion of Florfenicol and its metabolite florfenicol amine in swine tissues after intramuscular administration. **Journal of Food Chemistry**, v. 54, p. 9614-9619, 2006.
- Lewbart, G.A.; Papich, M.G.; Whitt-Smith, D. Pharmacokinetics of florfenicol in the red pacu (*Piaractus brachipomus*) after single dose intramuscular administration. **Journal of veterinary Pharmacology Therapeutics** v. 28, p. 317–319, 2005.
- Lim, J.H.; Kim, M.S.; Hwang, Y.H.; Song, I.B.; Park, B.K.; Yun, H.I. Plasma and tissue depletion of florfenicol in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration. **Aquaculture**, v. 307, p. 71-74, 2010.
- MPA, 2010. Ministério da Pesca e Aquicultura. Disponível em <http://www.mpa.gov.br/files/docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf>. Acessado em 02.11.2015.

- Park, B.K.; Lim, J.H.; Kim, M.S.; Yun, H.I. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in the Korean catfish (*Silurus asotus*). **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**, v. 29, p. 37–40, 2006.
- Park, B.K.; Lim, J.H.; Kim, M.S.; Hwang, Y.H.; Yun H.I. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 85–89, 2008.
- Salvo, A.D.; Della Rocca, G.; Terzetti, E.; Malvisi J. Florfenicol depletion in edible tissue of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and sea bream, *Sparus aurata* L. **Journal of Fish Diseases**, 2013.
- Schering-Plough, 2014. Boletim técnico: Período de retirada do Aquaflor® 50% Premix em filés de Tilápias. Disponível em http://www.nmaquicultura.com.br/uploads/artigo_arquivo/boletimresidualidadefiletilapia.pdf. Acessado em 16.09.2014.
- Shojaee Aliabadi, F.; Lees, P. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimisation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, p. 307–313, 2000.
- Wrzesinski, C.; Crouch, L.; Gaunt, P.; Holifield, D.; Bertrand, N.; Endris, R. Florfenicol residue depletion in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Aquaculture**, v. 253, p. 309–316, 2006.
- Park, B.K.; Lim, J.H.; Kim, M.S.; Yun, H.I. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in the Korean catfish (*Silurus asotus*). **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**, v. 29, p. 37–40, 2006.
- Park, B.K.; Lim, J.H.; Kim, M.S.; Hwang, Y.H.; Yun H.I. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 85–89, 2008.
- Salvo, A. D.; Della Rocca, G.; Terzetti, E.; Malvisi J. Florfenicol depletion in edible tissue of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and sea bream, *Sparus aurata* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, n. 8, p. 685–93, 2010.
- Sams, RA. Florfenicol: chemistry and metabolism of a novel broad-spectrum antibiotic. In: Proceedings of the XVIII World Buiatrics Congress. Bologna, Italy, p. 13–7, 1994.
- Xie, L.L; Wu, Z.X.; Chen, X.X.; Li, Q.; Yuan, J.; Liu, H.; Yang, Y. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in rice field eel (*Monopterus albus*) after a

single-dose intramuscular or oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 2012b.

Yanong, R.P.E.; Curtis, E.W.; Simmons, R.; Bhattaram, V.A.; Gopalakrishnan, M.; Ketabi, N.; Nagaraja, N.V.; Derendorf, H. Pharmacokinetic studies of florfenicol in koi carp and threespot gourami *Trichogaster trichopterus* after oral and intramuscular treatment. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 17, p. 129–137, 2005.

Zhao, H.Y.; Zhang, G.H.; Bai, L.; Zhu, S.; Shan, Q.; Zeng, D.P.; Sun Y.X. Pharmacokinetics of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus cuvieri*) after a single intramuscular or oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, p. 460-463, 2010.

Conclusão geral

Foram desenvolvidos e validados conforme os Guias da ANVISA (2012), do MAPA (Brasil, 2011) e da Comunidade Europeia (EC, 2002) e os seguintes métodos analíticos:

1. Determinação de florfenicol (FF) em ração medicada para peixes utilizando cromatografia líquida acoplada a detector de fluorescência (HPLC-FLU).
2. Determinação de FF e florfenicol amina (FFA) no plasma de tambaqui (*Colossoma macropomun*) utilizando HPLC-FLU.
3. Determinação de FF e FFA no músculo de tambaqui utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS Ion trap).

Os métodos apresentaram as características de facilidade no preparo da amostra, na sua execução, e rapidez de análise, assim por estarem em conformidade para o fim ao qual cada um se destinava e, inclusive, adequabilidade para fins de fiscalização.

Quanto aos aspectos farmacocinéticos, os resultados obtidos indicam uma rápida absorção com rápida eliminação do fármaco, ou ainda uma baixa absorção deste fármaco no plasma de tambaqui.

Pelos resultados obtidos verifica-se que o período de carência do FF em tambaqui, após tratamento com dose de 10 mg/kg pv, por 10 dias, via oral através da ração, é menor do que 1 dia.

Finalmente, recomenda-se que estudos adicionais sejam realizados em tambaquis afetados por bacterioses para, assim, avaliar a real eficácia do tratamento com FF na dose de 10 mg/kg pv, por 10 dias, na ração.

ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética / UNICAMP - IB



Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "**Florfenicol em Tabaqui (Colossoma Macropomum): Farmacocinética e Depleção**" (protocolo nº **3642-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes / Luciana da Conceição Castello Branco**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO ou CIBio**. É necessária aprovação da **CEUA/EMBRAPA – AMAZÔNIA OCIDENTAL**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **03 de novembro de 2014**.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Campinas, 03 de novembro de 2014.

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Anexo 2. Autorização da EMBRAPA – Amazônia Ocidental



Autorização

A Embrapa Amazônia Ocidental vem por meio deste documento autorizar a realização do projeto intitulado “Florfenicol em plasma e músculo de tambaqui (*Colossoma macropomum*)”, conforme procedimentos descritos pelo projeto submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp, protocolo nº3642-1.

A parte experimental deste projeto será desenvolvida no laboratório úmido do setor de piscicultura, sob a supervisão e coordenação da pesquisadora Edsandra Campos Chagas.

Manaus – AM, 24 de março de 2015.


Dr. Luiz Marcelo Brum Rossi
Chefe-Geral
Embrapa Amazônia Ocidental


Edsandra Campos Chagas
Pesquisadora
Embrapa Amazônia Ocidental