



RENATA ANTUNES ESTAIANO DE REZENDE

**ENROFLOXACINA NA PISCICULTURA: ESTUDO DA  
INCORPORAÇÃO DO FÁRMACO NA RAÇÃO VISANDO A  
REDUÇÃO DA TAXA DE LIXIVIAÇÃO NA ÁGUA**

**CAMPINAS  
2012**





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RENATA ANTUNES ESTAIANO DE REZENDE

**ENROFLOXACINA NA PISCICULTURA: ESTUDO DA  
INCORPORAÇÃO DO FÁRMACO NA RAÇÃO VISANDO A  
REDUÇÃO DA TAXA DE LIXIVIAÇÃO NA ÁGUA**

**Orinetador: Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes**

**Co- orientador: Dra. Marili Villa Nova Rodrigues**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

ESSE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA RENATA ANTUNES ESTAIANO DE REZENDE, ORIENTADA PELO PROFESSOR Dr. FELIX GUILLERMO REYES REYES.

**Prof Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes**

---

**CAMPINAS**

**2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

R339e Rezende, Renata Antunes Estaiano de, 1980-  
Enrofloxacin na piscicultura: estudo da incorporação  
do fármaco na ração visando a redução da taxa de  
lixiviação na água / Renata Antunes Estaiano de  
Rezende. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Felix Guillermo Reyes Reyes.  
Coorientador: Marili Villa Nova Rodrigues.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Piscicultura. 2. Medicamentos veterinários. 3.  
Ração medicada. 4. Enrofloxacin. 5. Fármacos -  
Lixiviação. I. Reyes Reyes, Felix Guillermo. II.  
Rodrigues, Marili Villa Nova. III. Universidade Estadual  
de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Enrofloxacin for pisciculture: study of the  
incorporation of the drug in the feed in order to reduce the rate of  
leaching in water

Palavras-chave em inglês:

Pisciculture

Veterinary drugs

Medicated feed

Enrofloxacin

Drugs - Leaching

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Felix Guillermo Reyes Reyes [Orientador]

Adilson Sartoratto

Roberson Sakabe

Data da defesa: 29-11-2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

.....  
Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes  
(Presidente)

.....  
Dr. Adilson Sartoratto  
(Membro)

.....  
Prof. Dr. Roberson Sakabe  
(Membro)

.....  
Prof.(a) Dr.(a) Fabiana Pilarski  
(Suplente)

.....  
Dr. Jonas Augusto Rizatto Paschoal  
(Suplente)

## *DEDICATÓRIA*

*Aos meus pais Américo e Maria e ao meu irmão Flávio,*

*Por toda a confiança e carinho dedicados, sempre encurtando distâncias e fazendo-me acreditar que tudo é possível quando realmente se quer. Por encorajar-me nos momentos em que mais precisei.*

*Por serem meus exemplos de vida e de amor*

*-A vocês, dedico este trabalho -*

## *AGRADECIMENTOS*

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

Ao Professor Dr. Felix pela orientação, incentivo, confiança e amizade;

A Dra Marili pela co-orientação, por me dar condições de realizar esse projeto, pelos inúmeros ensinamentos e acima de tudo, pela sua amizade;

Aos membros da banca examinadora (Dr. Adilson, Dr. Roberson, Dra. Fabiana e Dr. Jonas) pelas horas dedicadas e brilhantes sugestões que enriqueceram este trabalho;

À minha amada família (papai Américo, mamãe Maria e irmão Flávio) por ser meu porto seguro e razão do meu viver;

Aos meus queridos amigos Hamilton e Vladimir, meus irmãos conquistados ao longo da vida, por me acolherem no momento em que mais precisei e pela amizade incalculável;

Ao Luís Leoni e sua família, por serem minha segunda família aqui em Campinas;

À querida amiga Nenê (*in memoriam*) e sua doce irmã Dilce (Santo André) por sempre orar pela minha felicidade;

A todos os meus queridos amigos de luta da PSICO-USP que eu amo demais;

Aos incríveis amigos conquistados na Universidade São Judas Tadeu durante minha licenciatura e bacharelado em Farmácia;

Aos adoráveis amigos do laboratório de toxicologia de alimentos: Silvia Helena, Silvia Pilco, Maria José, Luciana, Michelle (e sua linda família), Rafaela, Jonas, Karin, Karen, Katia, Juliana (e Catarina), Raquel e Aline, pelos incontáveis momentos de estudo, alegria, felicidade e união;

Aos amigos do CPQBA: Rodney, Carmem, Ricardo, Vera, Adilson, Sinésio, Adriana, Alissa, Isabela, Layany, Paulo, Leticia, Brenda, Leandro, Marta, Célio e

todos os outros funcionários que me receberam de braços abertos, sempre me tratando tão carinhosamente;

Aos amigos do Lapoa - Jaboticabal (Caunesp) pelo imenso carinho e amizade.

Aos professores Ricardo D'Agostino, Dawerson Rodrigues e Rodney Ferreira Rodrigues pela amizade e brilhantes sugestões durante a escolha dos polímeros de revestimento.

Aos muitos colaboradores da Unicamp que me ajudaram nas diversas etapas deste trabalho. Agradecimentos especiais á professora Gláucia Pastore, ao Cosme e Marcos (secretaria de pós), Marquinhos (secretaria da diretoria) e Jardete (secretaria do DCA) e as amigos dos laboratórios vizinhos à toxicologia: Fernanda, Marcela (e Thiago), Polly, Rosemar, Jú Hashimoto e Aparecido;

E por último, mas não menos importante, aos meus amados amigos “de pelô” que tanto alegraram meus dias durante esses anos de estudo em Campinas: Bart, Nick, Shaska, Miucha, Ginger, Sugar, Pitico, Cadu e Fluke (*in memoriam*), eu os amo muito.

*A todos vocês, muito obrigada!*

*Renata Antunes Estaiano de Rezende*

## ÍNDICE

<b>RESUMO GERAL</b>	01
<b>SUMMARY</b>	03
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	05
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	07

## CAPÍTULO I

<b>Importância, consequências do uso de medicamentos veterinários na piscicultura e administração de enrofloxacina via ração.</b>	09
RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	11
INTRODUÇÃO .....	12
Panorama da produção brasileira e mundial de pescado .....	14
Tipos de criação de peixes .....	19
Doenças de origem bacteriana na piscicultura .....	21
Enrofloxacina: alternativa terapêutica contra bacterioses .....	26
Aspectos regulatórios e de inspeção .....	28
Consequência do uso de ração medicada na piscicultura .....	32
Lixiviação de fármacos em ambientes aquáticos .....	36
Polímeros empregados em revestimentos farmacêuticos .....	36
Métodos de determinação de fármacos veterinários em alimentos.....	40
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44

## CAPÍTULO II

<b>Incorporação de enrofloxacin</b>	<b>54</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>55</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>56</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
Padrão analítico, solventes e polímeros .....	59
Amostra de ração .....	59
Equipamentos .....	59
Preparo das soluções .....	60
Solução padrão .....	61
Solução de revestimento .....	61
Preparo da ração medicada .....	61
Processo de revestimento da ração medicada .....	61
Análises realizadas na ração medicada .....	62
Determinação do teor de umidade .....	62
Testes de lixiviação da ração medicada .....	62
Determinação de enrofloxacin .....	63
Conformidade do sistema analítico .....	63
Preparo de amostra .....	63
Validação do método analítico .....	64
Planejamento experimental .....	65

RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
Estudos preliminares para obtenção da ração medicada .....	66
Solubilidade dos polímeros na solução de revestimento .....	68
Condições operacionais de revestimento .....	69
Produção da ração medicada .....	69
Desenvolvimento e validação do método analítico para determinação da enrofloxacina na ração medicada .....	70
Amostragem e preparo da solução amostra .....	70
Estabelecimento das condições cromatográficas.....	71
Validação do método analítico.....	71
Estudo do processo de lixiviação .....	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	77
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>78</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>81</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

#### Importância, consequências do uso de medicamentos veterinários na piscicultura e administração de enrofloxacin via ração.

<b>Tabela 1.</b>	Produção de pescado mundial da aquicultura dos trinta maiores produtores nos anos de 2008 e 2009 (valores em ton).....	15
<b>Tabela 2.</b>	Desempenho da balança comercial de pescados no Brasil nos meses de janeiro e abril de cada ano, no período de 2003 a 2012 .....	17
<b>Tabela 3.</b>	Desempenho das exportações de pescado no Brasil nos meses de janeiro e abril de cada ano, no período de 2003 a 2012 .....	17
<b>Tabela 4.</b>	Desempenho das importações de pescado no Brasil nos meses de janeiro e abril de cada ano, no período de 2003 a 2012 .....	18
<b>Tabela 5.</b>	Consumo Per Capita aparente Anual: 2000 a 2010.....	19
<b>Tabela 6.</b>	Limites Máximos de Resíduos (LMRs) estabelecidos para as quinolonas em diferentes espécies e matrizes, por diferentes instituições .....	31
<b>Tabela 7.</b>	Classificação dos ensaios da validação analítica segundo sua finalidade .....	41
<b>Tabela 8.</b>	Parâmetros estudados na validação analítica de acordo com a finalidade e categoria.....	42

## CAPÍTULO II

**Incorporação de enrofloxacin em ração para peixes: técnicas de revestimento e avaliação da porcentagem de lixiviação do fármaco em ambientes aquáticos.**

<b>Tabela 1.</b>	Condições experimentais do ensaio de planejamento experimental fracionário $2^{4-1}$ .....	66
<b>Tabela 2.</b>	Resultados da validação do método analítico desenvolvido.....	73
<b>Tabela 3.</b>	Teor de enrofloxacin (ENR) nas rações medicadas utilizadas nos ensaios do planejamento experimental .....	74
<b>Tabela 4.</b>	Respostas do planejamento fracionário $2^{4-1}$ .....	75
<b>Tabela 5.</b>	Efeitos das variáveis estudadas no planejamento fracionário sobre a taxa de lixiviação do fármaco presente na ração.....	75

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Importância, consequências do uso de medicamentos veterinários na piscicultura e administração de enrofloxacin via ração.**

<b>Figura 1.</b>	Produção (ton.) da pesca extrativa e da aquicultura no Brasil de 1950 a 2008.....	16
<b>Figura 2.</b>	Tipos de criação de peixes encontrados no Brasil. (A e B) tanques rede; (C) açudes; (D) tanques de alvenaria; (E) tanques escavados e (F) caixas sem circulação de água.....	20
<b>Figura 3.</b>	Lesão ulcerativa (A) e ascite (B): infecção por <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	22

<b>Figura 4.</b>	Áreas necróticas nas nadadeiras (A) e brânquias (B) causadas por <i>Flavobacterium columnare</i> .....	23
<b>Figura 5.</b>	Natação irregular (A) e opacidade dos olhos (B) e ocasionados por <i>Streptococos</i> .....	24
<b>Figura 6.</b>	Estrutura da enrofloxacina (A) e ciprofloxacina (B).....	27

## CAPITULO II

### Incorporação de enrofloxacina em ração para peixes: técnicas de revestimento e avaliação da porcentagem de lixiviação do fármaco em ambientes aquáticos.

<b>Figura 1.</b>	Sistema de revestimento da ração por aspersão (A) vista frontal e (B) vista lateral .....	61
<b>Figura 2.</b>	Teste de lixiviação da ração medicada. (A e B) acomodação da ração em saquinhos de nylon, (C, D, E e F) ensaios de lixiviação com controle de tempo, pH e temperatura .....	62
<b>Figura 3.</b>	Preparo das soluções de revestimento com diferentes polímeros. (A) polivinilpirrolidona (PVP-K30) (totalmente solúvel); (B) gelatina (decantada); (C) maltodextrina (com turbidez) e (D) amido (decantado) .....	68
<b>Figura 4.</b>	Cromatogramas obtidos por HPLC a 280 nm da (A) ração branco e (B) ração medicada.....	71
<b>Figura 5.</b>	Curva analítica da enrofloxacina.....	72
<b>Figura 6.</b>	Efeito da polivinilpirrolidona (PVP-K30) 0,5% na taxa de lixiviação da enrofloxacina (ENR) contida na ração para a água comparado a ração sem a presença do PVP. ....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACN: Acetonitrila
- ANA: Agência Nacional de Águas
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC: Associação Oficial de Química Analítica  
*(Association of Official Analytical Chemists)*
- CBM: Concentração bactericida mínima
- CIM: Concentração inibitória mínima
- CIP: Ciprofloxacina
- CVMP: Comitê para Produtos Medicinais de Uso Veterinário  
*(Committee for Medicinal Products for Veterinary Use)*
- DNA: Ácido desoxirribonucleico *(Deoxyribonucleic acid)*
- DP: Desvio padrão
- EMA: Agência Europeia de Medicamentos *(European Commission)*
- ENR: Enrofloxacin
- FAO: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura  
*(Food and Agriculture Organization of the United Nations)*
- FDA: Administração de Drogas e Medicamentos *(Food and Drug Administration)*
- FLU: Flumequina
- HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência *(High Performance Liquid Chromatography)*
- IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.
- IDA: Ingestão Diária Aceitável
- INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- JECFA: Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares *(Joint Expert Committee on food Additives)*
- LMPR: Limite Mínimo de Desempenho Requerido

LMR: Limite Máximo de Resíduo  
LOD Limite de Detecção  
LOQ Limite de Quantificação  
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
MDIC: Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior  
MeOH: Metanol  
MPA: Ministério da Pesca e Aquicultura  
MS: Ministério da Saúde  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
ONU: Organização das Nações Unidas  
OTC: Oxitetraciclina  
PAMVet: Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos  
Veterinários  
PNCRP: Plano Nacional de Controle de Resíduo em Pescado  
PUFAs: Ácidos graxos poli-insaturados (*Polyunsaturated Fatty Acids*)  
PVP: Polivinilpirrolidona  
SAR: Sarafloxacina  
USP: Farmacopéia dos Estados Unidos (*United States Pharmacopeia*)

## RESUMO GERAL

A piscicultura no Brasil tem crescido de maneira significativa ao longo dos últimos 20 anos, refletido pelo aumento da produção com elevadas densidades de estocagem. Com a intensificação da atividade aquícola, o surgimento de surtos causados por vários agentes etiológicos tornam-se cada vez mais freqüentes, dentre eles as bacterioses. Para combater o agente responsável por essas enfermidades, muitos antibióticos são utilizados de maneira ilícita, podendo, além de não apresentar efetividade durante o tratamento, causar letalidade aos animais e danos ambientais. Atualmente, o Brasil possui apenas dois antimicrobianos aprovados para uso na aquicultura: florfenicol e oxitetraciclina. A enrofloxacina (ENR) é um antibiótico largamente utilizado na medicina veterinária por apresentar elevado potencial de eficácia no tratamento de bacterioses. Porém, apesar de no Brasil ainda não ter uso regulamentado na piscicultura, muitos produtores acabam utilizando-a de forma ilícita, sendo adicionada à ração ou em banhos de imersão. Esses procedimentos de administração favorecem a perda do fármaco por meio da lixiviação, promovem a mudança do ecossistema aquático, além de prejudicar a saúde animal e do consumidor. Possíveis alternativas para facilitar a administração da ENR, minimizando os problemas causados no meio ambiente, são os revestimentos na ração, um dos mais antigos processos farmacêuticos ainda existentes e com grande aplicabilidade em diversos segmentos. Para a formação desses revestimentos, os polímeros utilizados precisam ser compatíveis com as características químicas e físico-químicas do fármaco, garantindo homogeneidade ao produto final e redução de perda do medicamento ao longo do tempo de administração da ração. Para tanto, faz-se necessário o revestimento da ração medicada seguida da avaliação das taxas de lixiviação, a fim de avaliar as perdas do fármaco para o ambiente. Para alcançar este objetivo, é necessária a disponibilidade de um método analítico devidamente validado que garanta a determinação do teor, antes e depois do processo de lixiviação da ração medicada. O método desenvolvido para quantificação da ENR na ração foi baseado na técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de

arranjo de diodos (HPLC-DAD). O método foi validado considerando os seguintes parâmetros: linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão intradia e interdias, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação. Os resultados obtidos apresentaram conformidade com as recomendações dos guias de validação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2010), indicando que o método é apropriado para a determinação de ENR na ração medicada. O revestimento da ração medicada tanto com 0,5 % quanto com 2,0 % de polivinilpirrolidona (PVP-K30) reduziu a taxa de lixiviação da ENR na ração para a água, porém essa taxa de redução depende significativamente ( $p < 0,05$ ) da temperatura e do tempo de permanência da ração na água.

**Palavras chave:** piscicultura, medicamentos veterinários, ração medicada, enrofloxacin, lixiviação de fármacos.

## SUMMARY

Fish farming in Brazil has grown significantly over the past 20 years, reflected by increased production at high stocking densities. With the intensification of aquaculture, the emergence of outbreaks caused by various etiological agents becomes increasingly frequent, including the bacterial diseases. To combat the agents responsible for those diseases, many antibiotics are used illicitly. Nonetheless, in addition to the possibility of no effectiveness during treatment, they can induce lethality to the animals and cause environmental damage. Currently, Brazil has only two antimicrobials approved for use in aquaculture: florfenicol and oxytetracycline. Enrofloxacin (ENR) is an antibiotic widely used in veterinary medicine for presenting a high potential for efficacy in treating bacterial diseases. However, although in Brazil it is not yet regulated for use in fish farming, many farmers use it unlawfully, being added to the feed or by immersion baths. These procedures favor the drug loss through leaching from the feed, induce changes at the aquatic ecosystem, and endanger consumer and animal health. Possible alternatives to facilitate the administration of ENR, minimizing the problems caused in the environment are the feed coating, one of the oldest processes still exist with great applicability in several pharmaceutical segments. For the coating, polymers must be compatible with the chemical and physico-chemical characteristics of the drug, ensuring homogeneity of the final product and reduction of drug loss over time of feed administration. For this purpose, after coating the medicated feed becomes necessary to evaluate the leaching rate of the drug from the feed. To accomplish this it is required to develop and validate an analytical method that guarantees the determination of the drug content, before and after the leaching process of the medicated feed. The method for quantification of ENR in the feed was based on the technique of high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). The method was validated considering the following parameters: linearity, sensitivity, selectivity, intra-day and inter-day precision, accuracy, detection and quantification limits. The results showed compliance with the recommendations from the validation guide of the National Agency for Sanitary

Surveillance (ANVISA, 2003) and the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA, 2010), indicating that the method is suitable for the ENR determination on the medicated feed. The coating of the medicated feed with both: 0.5% and 2.0% polivinilpirrolydone (PVP-K30) reduced the leaching rate of the ENR from the feed to the water. However, the leaching rate reduction depends significantly ( $p < 0.05$ ) on the water temperature, as well as on the time residence of the feed in the water.

**Keywords:** fish farming, veterinary drugs, medicated feed, enrofloxacin, leaching of drugs.

## INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento populacional e a melhoria do poder aquisitivo dos consumidores, principalmente no que diz respeito à educação alimentar, refletem significativamente no aumento da procura e conseqüente oferta por alimentos de alto valor nutricional.

Uma das grandes alternativas para aumentar a disponibilidade de fontes de proteína animal é a criação intensiva de peixes, uma importante forma de sustento daqueles que se dedicam à atividade. No Brasil, os principais destinos da produção aquícola, advindos da piscicultura que não atingem volumes constantes e nem se enquadram nas regulamentações preconizadas para alcançar o mercado externo, seguem para a venda direta ao consumidor (MDCI, 2012). A fim de contribuir para amenizar o déficit estrutural da balança comercial e aumentar as taxas de exportação, o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) tem investido em estudos para melhoria da produção, principalmente por meio da implantação de parques aquícolas continentais e marinhos.

A conquista dos mercados internacionais relacionados à piscicultura está intimamente ligada à possibilidade de criação intensiva, caracterizada pela produção de grande volume de peixes em um menor volume de água, sempre levando em consideração as necessidades fisiológicas e homeostáticas dos animais (Pavanelli et al., 2008). Entretanto, o elevado povoamento de peixes num espaço limitado, somado ao manejo inadequado, inclusive o alimentar, piora significativamente a qualidade da água e afeta negativamente o desempenho dos animais, a produtividade e rentabilidade dos sistemas de criação (Beveride & Phillips, 1993; Tacon & Forster, 2003), além de favorecer o aparecimento de doenças oriundas de bactérias normalmente presentes na piscicultura (Martins et al., 2000).

Dentre as bactérias que mais afetam os animais aquáticos estão a *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare* e *Streptococcus spp*

A baixa disponibilidade de medicamentos aprovados para o uso na piscicultura no Brasil aumenta a probabilidade dos produtores utilizarem substâncias ilícitas de forma irregular, causando grandes problemas em toda a

cadeia produtiva, incluindo a saúde animal, humana e do ambiente (Díaz-Cruz & Barceló, 2007).

A enrofloxacin (ENR) é um antibiótico não regulamentado para utilização em peixes no Brasil, porém é muito eficaz contra as principais bacterioses que acometem os peixes (Lucchetti et al., 2004). Por ser permitida em alguns países, a ENR é muito utilizada de forma ilícita por produtores em seus sistemas de criação. Geralmente a administração do fármaco é realizada via ração, diluídos em óleo ou incluídos diretamente na água. Uma possível alternativa para garantir a homogeneidade da dose de ENR durante o período de tratamento dos animais e garantir a redução da lixiviação dessas substâncias no ambiente aquático é a utilização de rações revestidas com polímeros. Na indústria farmacêutica, os polímeros já são muito utilizados para revestir cápsulas e comprimidos pelo processo de aspersão (Ansel et al., 2005). Esse procedimento garante que a ração apresente uma dosagem adequada, assegurando a uniformidade do teor do fármaco durante o tratamento e minimizando as perdas durante o processo de lixiviação, se comparado a uma ração sem o revestimento.

Essa dissertação apresenta em seu primeiro capítulo uma revisão sobre o panorama da produção brasileira e mundial do pescado, o potencial brasileiro à exportação, as consequências negativas do manejo zootécnico inadequado que prejudicam a saúde dos animais, a utilização fora da conformidade de fármacos veterinários não aprovados para o tratamento das principais bacterioses na piscicultura, bem como o uso do antibiótico ENR em diversos países no combate as principais bactérias que acometem os sistemas intensivos de produção. O capítulo abordará a possibilidade de esse fármaco ser administrado via ração por incorporação na presença de polímeros farmacêuticos que, após processo de revestimento, garantem homogeneidade de dose, estabilidade e minimizem a taxa de lixiviação do fármaco no ambiente.

O segundo capítulo apresenta o estudo e desenvolvimento de um revestimento pelo processo de aspersão na ração, seguidos de testes de lixiviação na ração medicada, a partir de um planejamento experimental fatorial fracionado. Este planejamento avaliou os fatores de significância tempo, temperatura, pH e

concentração de polímero no processo de perda do princípio ativo presente na ração e o desenvolvimento e validação de um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD) para quantificar a ENR presente na ração medicada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR, L. V. Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. 8. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.. p. 204-226. 2005.

BEVERIDGE, M.C.M.; PHILLIPS, M.J. Environmental impact o tropical inland aquaculture. In: PULLIN, R.S.V.; ROSENTHAL H.; MACLEAN, J.L. (Eds.) Environment and aquaculture in developing countries. Metro Manila, Philippines International Center for Living Aquatic Resources Management p.213-236. 1993.

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

LUCCHETTI, D.; FABRIZI, L.; GUANDALINI, E.; PODESTA, E.; MARVASI, L; ZAGHINI, A.; CONIL, E. Long depletion time of enrofloxacin in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) Antimicrob. Agents Chemother., 48 pp. 3912–3917. 2004.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá: Ed. da Universidade Estadual de Maringá. 305 p. 2002.

MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; SILVA, C.A.H.; SCHALCH, S.H.C. Parasitic infections in cultivated

freshwater fishes. A survey of diagnosticated cases from 1993 to 1998. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.9, n.1, p.23-28. 2000.

MDCI. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet. 2012. Disponível em <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em agosto de 2012.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. Brasil 2010. Disponível em <<http://www.mpa.gov.br/imprensa/noticias/300-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2010>>. Acesso em agosto de 2012.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. Mais Pesca e Aquicultura: Plano de Desenvolvimento Sustentável. Brasil, 2010. Disponível em: [http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Jonathan/mais%20pesca%20eaquicultura/Cartilha\\_SEAP\\_final.pdf](http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Jonathan/mais%20pesca%20eaquicultura/Cartilha_SEAP_final.pdf). Acesso em agosto de 2011.

TACON, A.G.J.; FORSTER, I.P. Aquafeeds and the environment policy implications. Aquaculture, v.226, p.181-189. 2003.

## **CAPÍTULO I**

### **IMPORTÂNCIA, CONSEQUÊNCIAS DO USO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS NA PISCICULTURA E ADMINISTRAÇÃO DE ENROFLOXACINA VIA RAÇÃO**

**Capítulo a ser submetido para publicação na Revista Brasileira de Zootecnia**

## RESUMO

A intensificação da prática aquícola tem resultado no aparecimento e manifestação de enfermidades nos peixes, refletindo em grandes prejuízos à atividade de agronegócio. Para combater o agente responsável por essas enfermidades, muitos antibióticos são utilizados de maneira ilícita, podendo, além de não apresentar efetividade durante o tratamento, causar letalidade aos animais e danos ambientais. Atualmente, o Brasil possui apenas dois antimicrobianos aprovados para uso na aquicultura: florfenicol e oxitetraciclina. A enrofloxacina (ENR), uma fluorquinolona desenvolvida para exclusiva aplicação na medicina veterinária, possui amplo espectro de ação contra uma extensa classe de bactérias, incluindo aquelas resistentes à  $\beta$ -lactâmicos e sulfonamidas. Pelo seu potencial de eficácia, a ENR é largamente utilizada na piscicultura para o tratamento de doenças bacterianas em peixes, apesar de sua aplicação ser considerada irregular, pois seu uso ainda não é regulamentado no Brasil para organismos aquáticos. Geralmente os produtores acrescentam água, óleo mineral ou de soja à ração, previamente solubilizados com o fármaco a ser administrado. Essa prática não é a forma mais correta, pois esse procedimento pode diminuir a biodisponibilidade do fármaco durante o período de tratamento e conseqüentemente aumento da resistência bacteriana. Esse procedimento, além de ser prejudicial à saúde animal, também favorece a perda do medicamento através da lixiviação em ambientes aquáticos. Possíveis alternativas para facilitar a administração dos medicamentos veterinários na piscicultura é o revestimento da ração medicada, processo que minimiza a lixiviação do fármaco e garante homogeneidade necessária, ajuste e controle de dose do medicamento a ser administrado, o que assegura baixos níveis de resíduos no alimento e garante proteção a saúde humana.

**Palavras chave:** piscicultura, ração medicada, medicamento veterinário, enrofloxacina, lixiviação.

## **ABSTRACT**

The intensification of aquaculture practice has resulted in the emergence and manifestation of diseases in fish, reflecting in large losses to this agrobusiness activity. To combat the agents responsible for those diseases, many antibiotics are used illicitly. Nonetheless, in addition to the possibility of no effectiveness during treatment, they can induce lethality to the animals and cause human and environmental damage. Currently, Brazil has only two antimicrobials approved for use in aquaculture: florfenicol and oxytetracycline. The enrofloxacin, a fluoroquinolone developed exclusively for application in veterinary medicine, has broad spectrum of activity against a broad class of bacteria, including those resistant to  $\beta$ -lactams and sulfonamides. Due to its potential effectiveness, enrofloxacin is widely used in fish farming for the treatment of bacterial diseases in fish, although in Brazil its application is considered irregular because its use is not yet regulated to aquatic organisms. Generally, fish farmers treat the fish by adding the veterinary drug to the water or trough the feed by adding the drug using mineral or soybean oil. This practice is not a correct treating procedure, because could decrease the drug bioavailability during the treatment period and consequently increased bacterial resistance. In addition, this procedure besides being detrimental to the animal health, also favors the drug loss through leaching into the aquatic environment. Possible alternatives to improve the administration of the veterinary drugs in fish farming is the coating of the medicated feed, minimizing the drug leaching and, consequently protecting the environmental health, as well as ensuring a controlled and homogeneous dose treatment necessary to attend safe residues levels in the food, and protect the human health.

**Keywords:** pisciculture, medicated feed, veterinary drugs, enrofloxacin, leaching.

## INTRODUÇÃO

A aquicultura é considerada uma promissora atividade econômica mundial, pois é capaz de garantir emprego e renda aos profissionais envolvidos na área, gerar novos postos de trabalho, além de fornecer alimento de elevado valor nutricional (Arana, 1999).

Com o passar dos anos, a aquicultura sofreu inúmeras mudanças, se consolidando como importante atividade no mercado, substituindo parte do alimento antes advindo exclusivamente da pesca extrativa (Firetti, Garcia & Sales, 2007).

No Brasil, o crescimento de produção está relacionado, principalmente pelas características climáticas e geográficas favoráveis do país, além da elevada disponibilidade de grãos produzidos, que são essenciais para a elaboração de rações balanceadas para os animais (Ostrensky, Borghetti & Soto, 2008).

O estímulo causado pela rápida expansão na produção marítima e continental junto a crescente competição por mercados nacionais e internacionais fez com que a piscicultura seguisse em direção a produção intensiva, aumentando a utilização sistemas que incluíssem tanques com recirculação de água, tanques de alto fluxo ou tanques rede com altas densidades de animais ( $\text{kg peixe /m}^3$ ) também à dependência de concentrações cada vez maiores de rações completas e balanceadas, reduzindo a contribuição dos alimentos naturais antes abundantes nos sistemas produtivos, principalmente extrativistas. Essa prática atual faz o país enfrentar um grande desafio no sentido de desenvolver uma atividade de produção de maneira sustentável, que garanta qualidade ao alimento produzido de acordo com as exigências dos mercados interno e externo (Ostrensky, Borguetti & Soto, 2008).

O crescimento desse tipo de produção acarretou problemas sanitários relacionados à intensificação da atividade. O manejo zootécnico inadequado e o desequilíbrio ambiental atuam como fatores estressantes, causando alterações físico-químicas aos peixes, refletindo no aumento da concentração plasmática de

cortisol e consequente depressão dos mecanismos de defesa orgânica, aumentando a susceptibilidade às doenças infecciosas e parasitárias.

A grande maioria das bactérias e de outros patógenos se encontram naturalmente presentes no ambiente aquático, sendo praticamente impossível sua erradicação. Desta forma, as boas práticas de manejo, o uso de vacinas ou de terapias com antibióticos e antiparasitários torna-se ferramenta necessária dentro do manejo sanitário das piscícolas.

A enrofloxacina (ENR), um antimicrobiano da família das fluorquinolonas, é largamente utilizada na aquicultura devido a sua eficácia no tratamento de doenças em peixes, e por não ser regulamentada em alguns países, inclusive no Brasil, sua aplicação nesses animais é considerada ilegal (Lucchetti et al., 2004).

Os antibióticos comumente utilizados nos meios de produção contaminam o ambiente aquático de diversas maneiras, podendo ser principalmente de forma direta, durante o período de tratamento dos animais acometidos por bacterioses no sistema de criação ou de forma indireta, através do processo de lixiviação desses compostos, que seguem para outros corpos hídricos.

Poucas informações estão disponíveis no Brasil sobre como esses fármacos devem ser utilizados, qual concentração e a forma ideal de administração nos sistemas pesqueiros de produção. Devido a essa falta de conhecimento prévio e específico, as substâncias são utilizadas de forma indiscriminada, ocasionando impactos sérios na saúde animal, humana e ambiental.

Uma possível alternativa para administrar o medicamento de forma homogênea aos animais via ração, minimizando os problemas relacionados à concentração errônea de dose ou perdas por lixiviação em ambientes de produção, são os revestimentos com polímeros, muito utilizados na indústria farmacêutica com diversas finalidades, que incluem proteção e aumento da estabilidade do fármaco.

O objetivo desta revisão é abordar a atual realidade dos mercados nacionais e internacionais de produção aquícola, a utilização da ENR como antimicrobiano no combate das principais doenças que acometem os sistemas de

produção, os aspectos de regulamentação dessas substâncias na piscicultura, as vias comuns de administração desse fármaco aos animais, os problemas causados pela lixiviação desses produtos em ambientes aquáticos e as possíveis formas de revestimentos do pélete da ração que atuam principalmente como promissoras formas de se evitar perdas no sistema de produção pesqueira.

### **Panorama de produção brasileira e mundial de pescado**

Dados recentes do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) mostram que a piscicultura é um dos sistemas de criação intensiva que mais cresce no mundo, atingindo valores de 142 e 146 milhões de toneladas nos anos de 2008 e 2009, respectivamente.

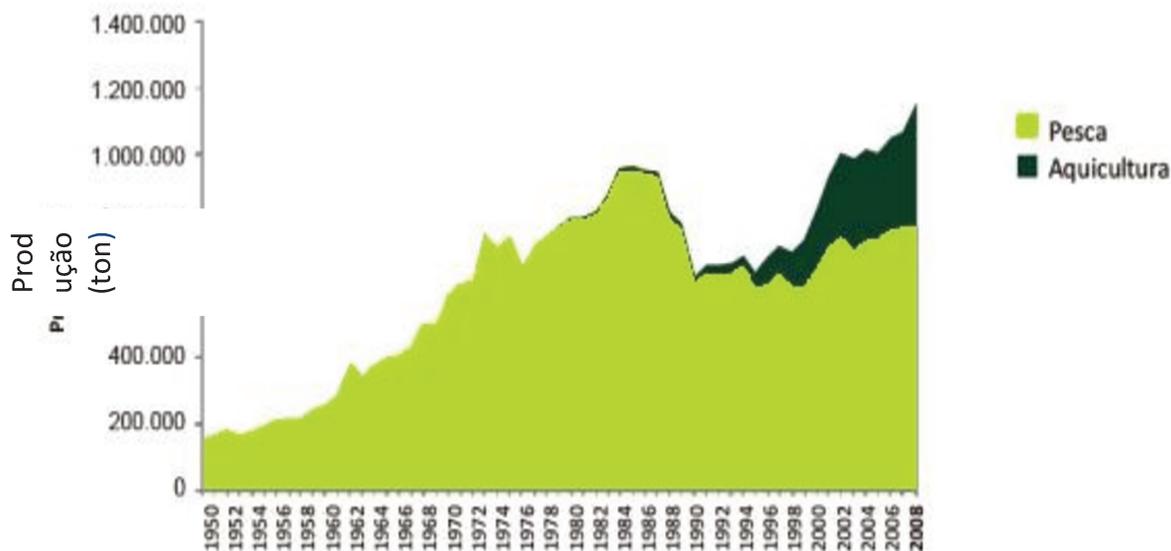
O Brasil, país que apresenta grande potencial para atender a demanda por produtos advindos da aquicultura, representou em 2009, apenas 0,86 % da produção mundial de pescado, produzindo 1.240.813 toneladas durante todo o período de 2009 (Tabela 1), subindo quatro posições se comparado ao ano anterior (MPA, 2010).

Os dados históricos de produção pesqueira mostram que houve um crescimento significativo da pesca extrativa no Brasil ao longo dos anos, desde 1950 até 1985, ano em que a produção atingiu volumes de 956.684 toneladas. Após esse período observou-se uma significativa queda de produção, mais precisamente a partir da década de 90. A partir do ano de 2000 a produção pesqueira voltou a crescer com o fortalecimento da aquicultura (Figura 1).

**Tabela 1:** Produção de pescado mundial dos trinta maiores produtores nos anos de 2008 e 2009 (valores em ton.).

Posição	País	2.008		2.009	
		Produção	%	Produção	%
1º	China	57.827.108	40,64	60.474.939	41,68
2º	Indonésia	8.860.745	6,23	9.815.202	6,76
3º	Índia	7.950.287	5,59	7.845.163	5,41
4º	Peru	7.448.994	5,23	6.964.446	4,8
5º	Japão	5.615.779	3,95	5.195.958	3,58
6º	Filipinas	4.972.358	3,49	5.083.131	3,5
7º	Vietnã	4.585.620	3,22	4.832.900	3,33
8º	Estados Unidos	4.856.867	3,41	4.710.453	3,25
9º	Chile	4.810.216	3,38	4.702.902	3,24
10º	Rússia	3.509.646	2,47	3.949.267	2,72
11º	Mianmar	3.168.562	2,23	3.545.186	2,44
12º	Noruega	3.279.730	2,30	3.486.277	2,4
13º	Coréia do Sul	3.358.475	2,36	3.199.177	2,2
14º	Tailândia	3.204.293	2,25	3.137.682	2,16
15º	Bangladesh	2.563.296	1,80	2.885.864	1,99
16º	Malásia	1.757.348	1,23	1.871.971	1,29
17º	México	1.745.757	1,23	1.773.644	1,22
18º	Brasil	1.156.423	0,81	1.240.813	0,86
19º	Marrocos	1.003.823	0,71	1.173.832	0,81
20º	Espanha	1.167.323	0,82	1.171.508	0,81
21º	Islândia	1.311.691	0,92	1.169.597	0,81
22º	Canadá	1.108.049	0,78	1.107.123	0,76
23º	Egito	1.067.631	0,75	1.079.501	0,74
24º	Taiwan	1.347.371	0,95	1.060.986	0,73
25º	Argentina	997.783	0,70	862.543	0,59
26º	Dinamarca	725.549	0,51	811.882	0,56
27º	Reino Unido	775.194	0,54	770.086	0,53
28º	Nigéria	744.575	0,52	751.006	0,52
29º	Coréia do Norte	713.250	0,50	713.350	0,49
30º	Equador	641.824	0,45	696.763	0,48

FONTE: MPA, 2010.



**Figura 1:** Produção (ton.) da pesca extrativa e da aquicultura do Brasil de 1950 a 2008. Fonte: MPA, 2010

Apesar do avanço na produção de pescado no Brasil, resultados negativos são observados na balança comercial nacional, tanto em volume quanto em valores comerciais (Tabela 2). Em relação a esse último item infere diretamente em seu preço final, o câmbio e as leis de mercado.

Os valores nacionais de importação (Tabela 3) crescem ao longo dos anos, de maneira inversa à exportação (Tabela 4), demonstrando que o país precisa investir na aquicultura a fim de reduzir o déficit na balança comercial. Essa tentativa de atender a crescente demanda nacional por pescados, sem depender majoritariamente de produtos advindos do mercado externo, deve partir de investimentos governamentais, aumentando a implantação de parques aquícolas continentais, marinhos, e investindo nas condições já existentes de produção (MDIC, 2012).

**Tabela 2:** Desempenho da balança comercial de pescados no Brasil nos meses de janeiro a abril de cada ano, no período de 2003 a 2012.

ANO	BALANÇA COMERCIAL (ton.)	BALANÇA COMERCIAL (US\$ milhões)
2003	-30.336	26.253
2004	-33.384	2.928
2005	-26.162	-3.693
2006	-54.432	-76.324
2007	-61.612	-142.008
2008	-70.619	-171.128
2009	-79.060	-192.485
2010	-86.517	-285.706
2011	-118.599	-442.368
2012	-134.476	-459.389

FONTE: MDIC, 2012.

**Tabela 3:** Desempenho das exportações de pescado no Brasil, nos meses de janeiro a abril de cada ano, no período de 2003 a 2012.

ANO	VOLUME (ton.)	VALOR (US\$ milhões)
2003	35.468	113.954
2004	33.899	119.751
2005	32.868	117.512
2006	27.282	102.977
2007	21.826	86.740
2008	15.450	93.885
2009	11.978	65.097
2010	11.045	49.357
2011	9.772	47.621
2012	13.775	53.858

FONTE: MDIC, 2012.

**Tabela 4:** Desempenho das importações de pescado no Brasil nos meses de janeiro a abril de cada ano, no período de 2003 a 2012.

ANO	VOLUME (ton.)	VALOR (US\$ milhões)
2003	65.804	87.701
2004	67.283	116.823
2005	59.030	121.205
2006	81.714	179.301
2007	83.438	228.748
2008	86.069	265.013
2009	91.038	257.582
2010	97.562	335.063
2011	128.371	489.989
2012	148.251	513.247

FONTE: MDIC, 2012

Indubitavelmente esse será o grande desafio tanto de órgãos públicos como do Ministério da Pesca e Aquicultura e suas Superintendências Regionais, quanto de órgãos privados como os setores produtivos da pesca, que deverão enfrentar nos próximos anos a demanda crescente e cada vez mais competitiva do mercado nacional e internacional de pescado. Uma ação que envolva todas as esferas da atividade aquícola deve promover resultados para colocar o Brasil num cenário de produção de pescado que caracterize melhor suas potencialidades (MDIC, 2012).

A oferta da produção de pescados está intimamente ligada à crescente procura por esse tipo de alimento ao longo dos anos. O Brasil, com seu grande potencial geográfico, segue a tendência de consumo (Tabela 5), onde se observa os mais de 190 milhões de brasileiros que até 2010 consumiam 9,75 kg/habitantes/ano (MPA, 2010).

**Tabela 5:** Consumo Per Capita Aparente Anual: 2000 a 2010.

Ano	População	Produção Nacional	Exportação Vivo kg	Importação Vivo kg	Total	kg/Hab/Ano
2010	190.732.694	1.264.764.913	42.349.267	636.590.994	1.859.006.640	9,75
2009	189.990.983	1.240.813.500	48.974.754	524.292.357	1.716.131.102	9,03
2008	187.885.996	1.156.364.000	60.202.490	474.060.279	1.570.221.789	8,36
2007	185.738.317	1.072.226.000	75.458.932	435.290.617	1.432.057.684	7,71
2006	183.554.255	1.050.808.000	95.635.374	381.469.478	1.336.642.105	7,28
2005	181.341.499	1.009.073.000	115.089.509	313.101.958	1.207.085.449	6,66
2004	179.113.540	1.015.914.000	132.717.354	314.915.073	1.198.111.720	6,69
2003	176.876.443	990.272.000	139.386.710	291.074.482	1.141.959.772	6,46
2002	174.632.960	1.006.869.000	123.184.358	297.122.149	1.180.806.790	6,76
2001	172.385.826	939.756.000	96.380.794	326.560.317	1.169.935.523	6,79
2000	170.143.121	843.376.500	73.917.315	372.648.325	1.142.107.510	6,71

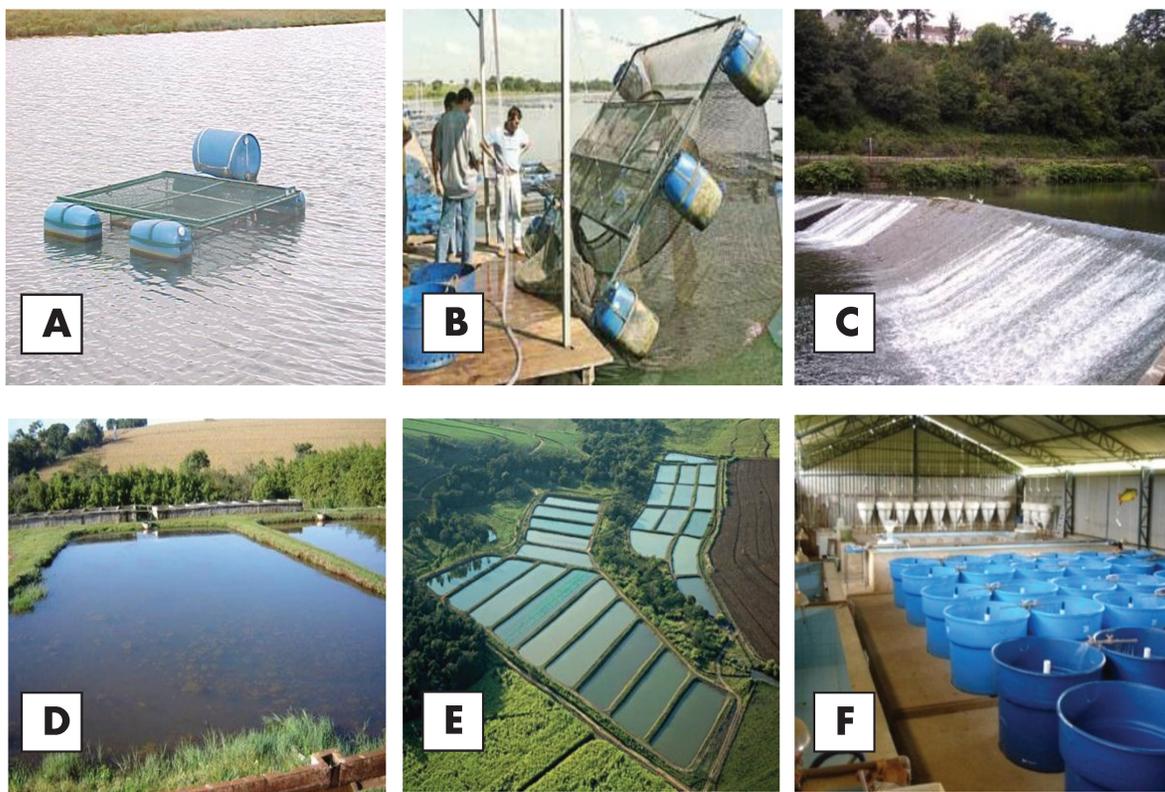
FONTE: MDIC, 2012

### **Tipos de criação de peixes**

No Brasil, diversas são as estruturas utilizadas nos sistemas intensivos de produção aquícola. As principais estruturas de criação utilizadas na piscicultura, segundo o Censo Aquícola Nacional realizado durante o ano de 2008, são os açudes, seguidos dos viveiros escavados, tanques rede (este apresentou crescimento apenas nos últimos anos), tanques de alvenaria, caixas sem circulação de água, dentre outros (Figura 2).

Os sistemas de produção brasileira de pescado são, em sua grande maioria, voltados às categorias *comerciais*, onde estão inseridos os sistemas de produção dos pequenos, médios e grandes produtores, seguidos dos *não comerciais*, que englobam os centros de pesquisas, unidades demonstrativas ou outros meios de produção onde não haja caracterização de comércio.

O principal destino dado à produção pesqueira nacional é a venda direta ao consumidor, por não atingir volumes constantes e nem se enquadrar nas regularidades preconizadas para atingir o mercado externo (MDCI, 2012).



**Figura 2:** Tipos de criação de peixes encontrados no Brasil. (A e B) tanques rede; (C) açudes; (D) tanques de alvenaria; (E) tanques escavados e (F) caixas sem circulação de água.

FONTE: MAPA (2010).

A exportação geralmente é realizada por grandes produtores e/ou processadoras de pescado que compram de várias unidades aquícolas para atender a essa demanda. As poucas propriedades que conseguiram exportar, precisaram se adequar quanto a produção constante de pescado ao longo do ano (periodicidade), rígido controle sanitário e uma boa infraestrutura para o processamento e transporte (MAPA, 2010)

## **Doenças de origem bacteriana na piscicultura**

Na piscicultura intensiva, a criação dos animais se dá a partir da possibilidade de se criar num volume pequeno de água uma alta densidade de peixes, em regime de confinamento (kg peixe/ m<sup>3</sup>) Nesse tipo de sistema de produção, os animais quase que inevitavelmente vivem em constante condição de estresse, sendo necessária a adoção das boas práticas de manejo para evitar o aparecimento de surtos infecciosos e/ ou parasitários entre os animais.

No que diz respeito à saúde dos peixes produzidos, os fatores estressantes presentes nesse tipo de produção, como o manejo zootécnico inadequado e o desequilíbrio ambiental, contribuem significativamente para o aparecimento e disseminação dos agentes patogênicos (Pavanelli et al., 2008), pois o estresse ocasionado por esse desequilíbrio animal – agente patogênico – ambiente promove alterações fisiológicas em busca da homeostase, tais como o aumento da concentração plasmática de cortisol e consequente depressão do sistema imune (Pilarski, Rossini & Ceccarelli, 2008).

Para combater este desequilíbrio ocasionado pelo estresse, várias estratégias podem ser adotadas, sendo aquelas relacionadas ao manejo preventivo as mais adequadas. As boas práticas de manejo quando utilizadas de forma racional dentro da atividade aquícola intensiva pode promover queda na taxa de mortalidade com consequente aumento de sua produtividade.

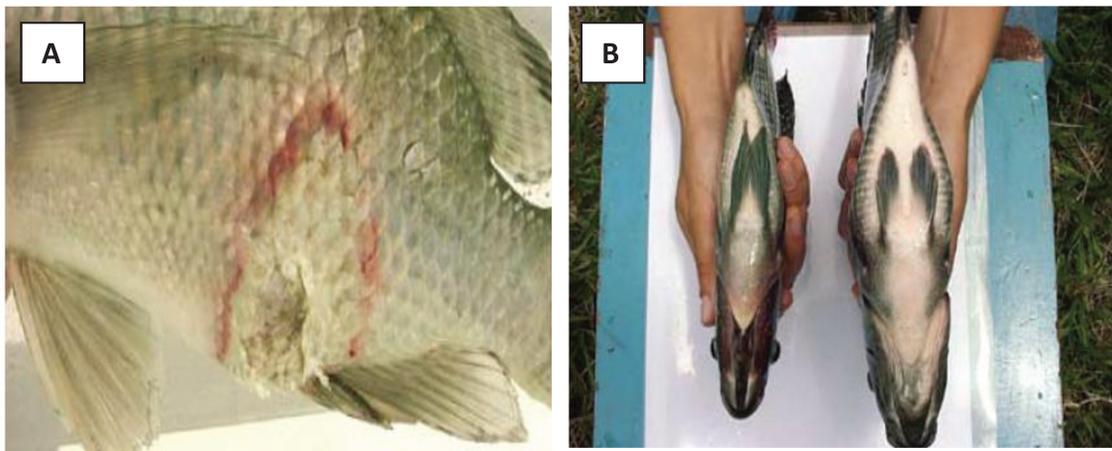
A doença infecciosa causada por bactérias e outros patógenos é considerada um problema sério na piscicultura por representar potencial risco na produção, já que estão normalmente presentes nos ambientes e nos peixes (MARTINS et al., 2000). Essas infecções quando não controladas apresentam consequências graves como, por exemplo, lesões que inviabilizam sua comercialização ou elevada mortalidade causando grandes prejuízos econômicos.

Dentre as enfermidades causadas por bactérias em peixes, foram descritas espécies patogênicas dentro de uma variedade de grupos bacterianos, sendo que os bacilos gram–negativos representam a porcentagem mais elevada de causas infecciosas nestes animais (Barja, Estevez & Toranzo, 1988).

Entre as bacterioses de peixes de importância no Brasil, pode-se listar *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare* e *Streptococcus ssp.*

A *Aeromonas hydrophila*, responsável pela doença denominada septicemia hemorrágica (Figura 3), é comumente encontrada no mundo todo, sendo geralmente localizada na superfície da mucosa e órgãos internos de peixes clinicamente saudáveis (Macmillan, 1985).

Essa bactéria pode acometer tanto peixes de água doce (Merino et al., 1985; Kirov et al., 2002; Who, 2004) como outros vertebrados, incluindo o homem (Vivas et al., 2004).

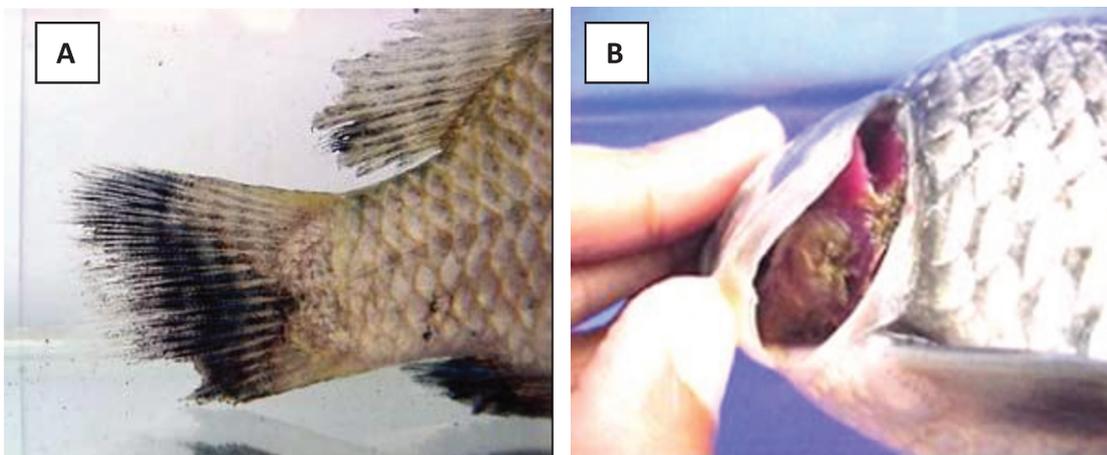


**Figura 3:** Lesão ulcerativa (A) e ascite (B): infecção por *Aeromonas hydrophila*

FONTE: [http://www.acquaimagem.com.br/docs/Pan89\\_Kubitza.pdf](http://www.acquaimagem.com.br/docs/Pan89_Kubitza.pdf)

Considerada oportunista, se manifestam na maioria das vezes durante o período em que o animal está susceptível a outros patógenos presentes no ambiente, como por exemplo, parasitos, vírus e bactérias (Dooley & Trust, 1988; Merino et al., 1985), ou pelo estresse causado por condições ambientais desfavoráveis como, por exemplo, altas temperaturas, elevadas densidades de estocagem, poluição orgânica e hipóxia (Jeney & Jeney, 1995). Apesar de ser considerado um importante patógeno da piscicultura, a *Aeromonas hydrophila* compõe naturalmente a microbiota do intestino de animais saudáveis (Cipriano, 2001).

A bactéria *Flavobacterium columnare* (Figura 4) apresenta, desde a década de 80, um grande impacto negativo na piscicultura.



**Figura 4:** Áreas necróticas nas nadadeiras (A) e brânquias (B) causadas por *Flavobacterium columnare*

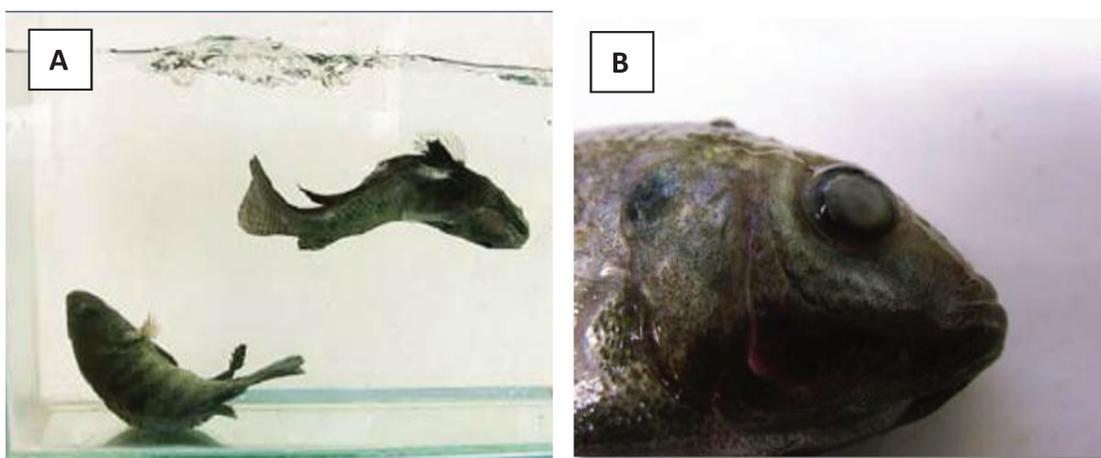
FONTE: <http://dnr.wi.gov/fish/health/columnaris.html>

Essa bactéria é considerada oportunista e, assim como a *Aeromonas hydrophila*, também compõe parte da microbiota normal da água, solo, pele, intestino e brânquias dos peixes (Barja & Esteves - Toranzo, 1988). Porém, em condições adversas essa bactéria consegue invadir o hospedeiro desencadeando epidemias (Wakabayashi & Egusa, 1972). Condições desfavoráveis são consideradas como estressantes aos peixes, sendo capazes de alterar sua função imune, quando glicocorticoides são secretados em resposta a tais estímulos, reduzindo a função imune dos animais com aumento da susceptibilidade a doenças, entre elas a columnariose (Pilarski, Rossini & Ceccarelli, 2008).

A Columnariose é considerada um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento da piscicultura mundial em face ao seu potencial de virulência, particularmente em alevinos e peixes estressados. Seu alto custo de tratamento, muitas vezes torna o processo inviável, (Soltani, Munday & Burke, 1996).

Outra enfermidade de grande destaque na piscicultura, principalmente na criação intensiva de tilápias, é a septicemia causada por *Streptococcus spp*

(SURESH, 1998). Estas são bactérias oportunistas amplamente distribuídas no ambiente aquático e sua patogenicidade está associada, assim com nas outras bacterioses citadas anteriormente, às condições de estresse do hospedeiro (Bunch & Bejerano,1997). Os estreptococos patogênicos possuem várias características que contribuem para sua virulência, tais como aderência às superfícies epiteliais, invasão celular do epitélio e/ou endotélio e injúria direta nos tecidos, causando a infecção como consequência (Figura 5).



**Figura 5:** Natação irregular (A) e opacidade dos olhos (B) e ocasionados por *Streptococcus spp.*

FONTE: [http://www.acquaimagem.com.br/docs/Pan107\\_Kubitza.pdf](http://www.acquaimagem.com.br/docs/Pan107_Kubitza.pdf)

Para um correto tratamento dessas bacterioses é exigido um prévio conhecimento do agente causador da enfermidade em questão. Muitas vezes, para controlar uma determinada doença faz-se necessário o uso de antibióticos que, se utilizados de forma incorreta, além de não serem efetivos durante o tratamento, podem também provocar danos como, por exemplo, o aumento da resistência bacteriana nesses animais e nos meios de produção onde eles se encontram.

Muitos piscicultores têm utilizado, de maneira indiscriminada, produtos químicos para prevenir e controlar o desenvolvimento e a proliferação de agentes

patogênicos, sem ter conhecimento de sua eficácia e dos prejuízos que isso pode acarretar ao animal, ao ser humano e ao ambiente.

Raros são os países que dispõem de dados abrangentes no que diz respeito à quantidade de fármacos veterinários utilizados nos sistemas de produção (Días-Cruz & Barcelo, 2007). Entretanto, estima-se que mais de 70% dos fármacos utilizados na medicina veterinária destinada à piscicultura a nível mundial sejam agentes antibióticos (Thiele & Bruhn, 2003). Atualmente, o Brasil possui apenas dois antimicrobianos aprovados para uso na aquicultura: florfenicol e oxitetraciclina.

As formas de administração dos fármacos aos animais são distintas, podendo ser via alimentação quando adicionados à ração ou em banhos de imersão, diretamente administrados nos tanques de criação. A veiculação do antibiótico via ração é a mais recomendada e conveniente, pois a quantidade do fármaco disponibilizada nos sistemas de produção é menor que a utilizada diretamente na água, gerando assim menores taxas de resíduos no ambiente. (Ferreira et al., 2007).

No Brasil, a utilização indiscriminada de fármacos na piscicultura é ainda mais grave, principalmente devido à falta de informação sobre a biodiversidade dos ecossistemas aquáticos, além da carência de estudos a respeito dos produtos utilizados no tratamento de enfermidades de peixes, doses ideais, períodos de carência e impactos gerados nos organismos alvo, não alvo e meio ambiente. Tais fatores impedem a sistematização de dados abrangentes que prejudicam o desenvolvimento de políticas públicas, os planejamentos de ação de fiscalização e elaboração de métodos de produção nos recursos hídricos (Buss, 2002).

A ausência de dados confiáveis com embasamento científico gera dados incertos e especulação a respeito dos impactos ambientais oriundos do uso dos antimicrobianos na aquicultura. A presença dessas substâncias no ambiente pode ocasionar alterações prejudiciais em todo o ecossistema. Afinal, não são necessárias grandes concentrações dessas substâncias para que os organismos presentes no meio sejam afetados. Desta forma, toda e qualquer técnica voltada à sanidade ambiental e de manejo deve ser seguida de modo a assegurar alimentos

de origem confiável, sempre levando em consideração a conservação e a integridade do meio em que os sistemas de produção se encontram.

### **Enrofloxacina: alternativa terapêutica contra bacterioses**

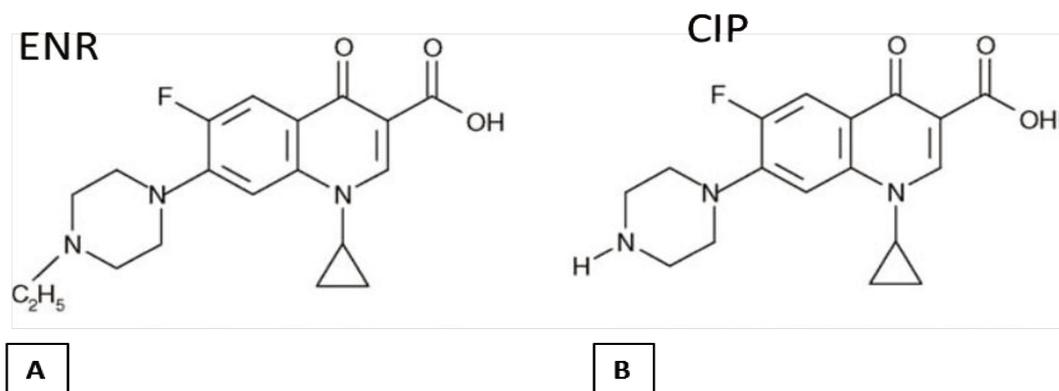
As quinolonas são agentes antibióticos sintéticos, especialmente ativos contra bactérias gram-negativas, eficazes e largamente empregados no tratamento de diversas infecções na medicina humana e veterinária, incluindo a aquicultura (Botsoglou & Fletouris, 2001). Elas são muito utilizadas no tratamento de septicemia generalizada e doenças de pele em peixes, exercendo efeito antibacteriano através da inibição da DNA-girase, que é responsável pela separação dos dois filamentos de DNA de dupla hélice, essencial para a replicação ou transcrição do DNA bacteriano (Buffé, Araújo & Dalla Costa, 2001).

Os ácidos oxolínico e nalidíxico são os antibióticos mais antigos da classe das quinolonas de primeira geração e até hoje são largamente utilizados mundialmente na profilaxia de doenças bacterianas na piscicultura. Já as fluorquinolonas, como a enrofloxacina (ENR), flumequina (FLU) e sarafloxacina (SAR), são bem mais utilizadas na piscicultura por apresentar eficácia contra as principais bacterioses, apesar de não serem permitidas e regulamentadas para uso em alguns países, inclusive no Brasil.

A principal diferença entre quinolonas e fluorquinolonas é a presença de um átomo de flúor no C-6 e um grupo piperazinil no C-7, nas fluorquinolonas. Os grupos coplanares do carbonil (C=O) nas posições três e quatro são os responsáveis pelas atividades antimicrobianas das fluorquinolonas. O átomo de flúor na posição seis é eficaz contra as bactérias gram-negativas e aumenta o espectro de ação para as bactérias gram-positivas. O grupo C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, unido ao anel piperazínico, aumenta a capacidade de absorção pelos tecidos (Samuelsen, 2006).

A ENR (Figura 6A) é um antibacteriano sintético e foi a primeira fluorquinolona desenvolvida para exclusiva aplicação veterinária. Tem utilização terapêutica em bovinos, suínos, ovinos e caprinos no tratamento de infecções do

trato urinário, respiratório e da pele. Também é usada em animais de pequeno porte, como cães e gatos, no combate a diversos tipos de infecções, pois possui amplo espectro de ação contra uma extensa classe de bactérias, incluindo aquelas resistentes à  $\beta$ -lactâmicos e sulfonamidas.



**Figura 6:** Estrutura da enrofloxacina (A) e ciprofloxacina (B)

A ENR é largamente utilizada na aquicultura devido a sua eficácia no tratamento de doenças em peixes. Este antimicrobiano não é regulamentado em alguns países, o que torna ilegal sua aplicação nesses animais (Samuelsen, 2006; Lucchetti et al., 2004).

As propriedades farmacocinéticas da ENR em peixes têm sido estudadas por diversos autores em diversas espécies de peixes como Salmão do Atlântico – *Salmo salar* (Martinsen, Horsberg & Burke, 1994; Stoffregen et al., 1997), Pacu vermelho – *Colossoma brachypomum* (Lewbart et al., 1997), Truta arco-íris – *Oncorhynchus mykiss* (Bowser et al., 1992), dentre outros. Na maioria das espécies em que foi estudada a eliminação do fármaco, este demonstrou ter um metabolismo variável. Muitos desses estudos em peixes demonstraram que a biotransformação da ENR em CIP, também ativa, ocorre em quase todas as espécies.

Como características do grupo, as quinolonas induzem morte bacteriana concentração-dependente e são consideradas bactericidas por possuírem Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), com magnitude semelhante. Além disso, elas também produzem um prolongado

efeito pós-antibiótico e são caracterizadas por uma liberação lenta a partir do tecido, apresentando, portanto, tempo de meia-vida relativamente longo, o que assegura o prolongamento do intervalo entre as doses, permitindo a administração de uma dose única diária (Buffé; Araújo & Dalla Costa, 2001).

Pelo fato do tempo de meia-vida ser longo, a ampla utilização da ENR em peixes destinados ao consumo humano deve ser muito bem avaliado, pois seu produto de biotransformação, a ciprofloxacina (Figura 6B), muito utilizada na terapêutica humana por também apresentar atividade antibacteriana, pode persistir em tecidos animais comestíveis por um tempo considerável, caso não sejam obedecidos a dosagem do fármaco durante o período de tratamento (Lucchetti et al., 2004) e o tempo de carência recomendado pela Comissão Econômica Européia (nº 82/ 2001) para o uso em substâncias não permitidas na aquicultura de 500°C/ dia. (EEC, 2001).

### **Aspectos regulatórios e de inspeção**

O Comitê FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) estabelece valores seguros para os níveis de ingestão diária de alguns dos antimicrobianos, após avaliação dos estudos toxicológicos. Esse órgão científico presta assessoria ao *Codex Alimentarius* no que diz respeito a assuntos envolvendo resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, e estabelece valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) e Limite Máximo de Resíduo (LMR) para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal.

Para medicamentos de uso na medicina veterinária, o LMR é definido como a concentração tolerável máxima de resíduo no alimento, resultante de seu uso. O LMR é baseado no tipo e quantidade de resíduo que não induz efeito adverso à saúde humana, considerando-se a ingestão diária aceitável (IDA) do princípio ativo. A IDA é a quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente durante toda a vida do indivíduo, sem provocar danos a sua saúde. Ela é expressa nas informações toxicológicas disponíveis daquele composto na fase de avaliação (JECFA, 2007).

As recomendações do JECFA são adotadas pelo *Codex Alimentarius* no intuito de proteger a saúde dos consumidores e desenvolver o comércio global de alimentos. Essas recomendações são úteis para as agências governamentais e de saúde pública definirem medidas de vigilância sanitária a serem seguidas pelo país. Atualmente, poucos países estabelecem LMRs para medicamentos veterinários em peixes. Portanto, o monitoramento dos níveis de resíduos em produtos derivados da piscicultura é de fundamental importância para assegurar a saúde e principalmente impedir barreiras às exportações, fortalecendo assim o desenvolvimento da atividade aquícola no país.

Na Comunidade Europeia, o órgão responsável pelo estabelecimento dos LMR para medicamentos de uso veterinário em alimentos de origem animal é o Comitê de Produtos Medicinais de Uso Veterinário (*Committee for Medicinal Products for Veterinary Use - CVMP*) da Agência de Avaliação Medicinal Europeia (EMA, 2008). No que se refere a substâncias de uso proibido, para as quais não há um LMR estabelecido, a Comunidade Europeia (Diretiva 2002/657/EC) propõe o estabelecimento de um limite mínimo de desempenho requerido (LMPR), que representa a menor concentração da substância na amostra, em nível de detectabilidade e confirmação (EC, 2002).

No Brasil, em 1995, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR, instituído pela portaria Ministerial nº 527 de 15/08/1995. Este plano previa a adoção de programas setoriais de controle de remanescentes residuais em carne, leite, mel e pescado, em decorrência do uso de agrotóxicos e medicamentos veterinários, ou por acidentes envolvendo contaminantes ambientais. No entanto, até o início de 2006, dos programas setoriais elaborados, somente o de controle em produtos cárneos estava contemplado. A Portaria Ministerial nº 50, de 20/02/2006, estendeu a execução do PCNR também para outras fontes de carne (bovina, aves, suína e equina), leite, mel, ovos e pescado, com enfoque apenas em algumas substâncias: nitrofurazona, furazolidona, furaltadona, nitrofurantoina e cloranfenicol. Em 2010, a ENR foi incluída nesse plano.

Preocupados com o avanço da utilização desses medicamentos veterinários nos principais meios de produção, o Ministério da Saúde (MS), através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou, em 2003, o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet – (Resolução RDC nº 253 de 16/09/2003, publicada no Diário Oficial da União de 18/09/2003). Este programa prevê o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal expostos ao consumo, porém apenas análises em amostras de leite ainda estão em fase de implementação.

O LMR estabelecido para a ENR na Comunidade Europeia, onde seu uso é legalizado, corresponde a  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Esse valor se refere à análise em músculo e pele em proporções naturais, devendo ser expresso como a somatória da ENR e seu produto de biotransformação, a CIP, visto que esse último possui atividade antimicrobiana e é muito utilizado na terapia humana.

No Brasil, o Ministério da Aquicultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determinou apenas para fins de fiscalização, já que a ENR não é legalizada para o uso na piscicultura no Brasil, um valor de LMR de  $100\mu\text{g kg}^{-1}$ . O mesmo valor se aplica para resíduos de seu metabólito, a ciprofloxacina.

Os LMRs estabelecidos na Comunidade Europeia, Estados Unidos da América, Japão e Brasil para as quinolonas em diversas matrizes, são apresentados na Tabela 6.

A implementação na atividade aquícola de sistemas de controle e análise de risco alimentar vem sendo discutida como uma importante ferramenta de manejo para garantia de segurança alimentar ao consumidor. Países que declinarem da adoção desse sistema de garantia poderão futuramente comprometer suas exportações, resultando em perdas econômicas significativas (Winkaler, 2008).

**Tabela 6.** Limites Máximos de Resíduos (LMRs) estabelecidos para as quinolonas em diferentes espécies e matrizes, por diferentes instituições.

Quinolona	Residuo marcador	Espécie	Matriz	MAPA 2010 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	EMEA 2008 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	FDA 2010 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	FFCR <sup>1</sup> 2010 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
			Músculo	100	100	-	50
	Somatório de enrofloxacina e ciprofloxacina	Aves de capoeira	Pele e músculo	-	200	-	50
			Fígado	-	2500	-	100
			Rim	-	750	-	100
			Músculo	-	200	-	50
	Somatório de enrofloxacina e ciprofloxacina	Bovinos	Pele	-	-	-	50
			Fígado	-	3000	100000	100
			Rim	-	300	-	100
			Leite	-	-	-	50
enrofloxacina	Somatório de enrofloxacina e ciprofloxacina	Suínos	Músculo	-	300	-	50
			Pele e músculo	-	500	-	50
			Fígado	-	2000	500	100
			Rim	-	500	-	100
	Somatório de enrofloxacina e ciprofloxacina	Outras espécies produtoras de alimentos	Pele e músculo	-	100	-	-
			Pele	-	200	-	-
			Fígado	-	2000	-	-
			Rim	-	300	-	-
	somatório de enrofloxacina e ciprofloxacina	Pescado	Pele e músculo	-	100	-	-
	enrofloxacina	Pescado	Músculo	100	-	-	-
ciprofloxacina	ciprofloxacina	Pescado	Músculo	100	-	-	-

<sup>1</sup>Japan Food Chemical Research Foundation.

FONTE: MAPA, 2010; EMEA, 2008; FDA, 2010; FFCR, 2010.

## **Consequências do uso de ração medicada na piscicultura**

Os peixes são animais pecilotérmicos com dependência do meio em que vivem, sendo muito afetados por qualquer variação dessas condições. Qualquer mudança ambiental, inclusive em seus hábitos alimentares, reflete significativamente no comportamento dos animais e em suas funções fisiológicas.

O uso de rações não balanceadas diminui a absorção de nutrientes pelos peixes causando redução na taxa de crescimento e aumentando a probabilidade de mortes e surtos infecciosos. Já uma alimentação em excesso reflete num excedente de matéria orgânica, reduzindo a qualidade da água e aumentando a carga poluidora dos meios de produção (Cyrino et al., 2010).

As rações utilizadas na piscicultura precisam necessariamente apresentar características específicas no que diz respeito às exigências nutricionais, minimizar impactos ambientais e nos sistemas intensivos de produção (Valenti, 2000; Henry-Silva, 2001).

A elaboração de uma ração balanceada deve levar em consideração principalmente as características fisiológicas de cada espécie, devendo suprir a exigência alimentar dos animais, considerando que o sistema de confinamento de produção apresenta acesso restrito ao alimento natural disponível no ambiente (Ono & Kubitzka 2003). Dentro desse contexto, o tamanho do grânulo, a aceitabilidade da ração e o balanço nutricional devem ser compatíveis com a capacidade de ingestão dos organismos (Midlen & Redding, 1998), assim como deve ser considerada a estabilidade do pelete e do fármaco nele adicionado.

Para garantir um melhor aproveitamento nutricional, alguns tipos de preparo de rações são mais adequados. Segundo Ono & Kubitzka (2003), as rações preparadas pelo processo de extrusão são as mais apropriadas, pois sua característica de fluabilidade facilita a observação do consumo além de promover uma maior digestibilidade dos ingredientes que compõem ração, melhorando a eficiência alimentar por parte dos peixes e diminuindo, por consequência, a carga de poluentes na água de criação (Roubach, 2002)

Com o aumento da produtividade e o conseqüente aumento da densidade populacional da produção intensiva, a qualidade da água é afetada negativamente, o que reduz consideravelmente o desempenho dos peixes. Conseqüentemente a isso é observada uma queda na produtividade e rentabilidade desses sistemas de criação (Beveride & Phillips, 1993; Tacon & Forester, 2003). Essa alteração na qualidade da água promove estresse no animal (HARRIS & BIRD, 2000), ocasionando o aumento do cortisol plasmático, e induzindo-o a imunossupressão (Urbinati & Carneiro, 2004), o que aumenta a sensibilidade dos peixes a infecções bacterianas (Harris & Bird, 2000).

O estresse causado nos peixes presentes nos sistemas de produção, durante o manejo reduz o consumo de ração e ganho de peso desses animais estendendo o período de criação e elevando os custos de produção, principalmente quando associados a tratamento com usos de medicamentos veterinários ou necessidade de serviços especializados.

A presença de resíduos medicamentosos, disponíveis tanto no pescado quanto no meio de produção, representa riscos à saúde humana devido à sua toxicidade, assim como potencial impacto ambiental e constitui entrave à exportação.

A baixa disponibilidade de variedades de medicamentos veterinários aprovados para uso na aquicultura no Brasil, tem obrigado os produtores a utilizarem medicamentos legislados para outras espécies animais, ou mesmo quimioterápicos não legislados, de forma desordenada, colocando em risco toda a cadeia produtiva devido à riscos ambientais e de saúde pública (Carneiro & Castro, 2005). Outro fator preocupante é a forma de veiculação desses fármacos na ração, que não garante a homogeneidade na dosagem para um efetivo tratamento.

Esses fármacos são comumente administrados adicionados à ração através de diferentes processos utilizados para a confecção das rações comerciais ou de pesquisa.

A utilização do fármaco via alimentação é mais conveniente, pois a quantidade necessária de antibiótico nesse tipo de tratamento é menor que a

utilizada na água e o resíduo gerado para o ambiente também é menor (Ferreira et al., 2007). Alguns tipos de preparo são específicos para cada meio de produção, tipo de tratamento e espécie de animal.

O preparo da ração por extrusão se dá através do processo no qual há a necessidade de utilização de altas temperaturas ( $\pm 105$  °C) Devido a esse processo ser realizado em altas temperaturas, a inclusão de antibióticos na ração antes de sua elaboração pode promover a alteração físico química do princípio ativo desses medicamentos. Existem também as rações peletizadas, muito utilizadas em escala laboratorial. O lado negativo desse tipo de produção é a alta densidade dos grânulos e a não fluabilidade da ração, quando administrada nos diferentes tipos de produção (Ferreira et al., 2007).

Há poucos estudos em relação ao uso dos antimicrobianos antes do processo de peletização e/ou extrusão, principalmente no que diz respeito a sua estabilidade e eficácia. Os tratamentos geralmente são realizados com a inclusão do óleo e o antimicrobiano na ração comercial. Esse procedimento inclusive consta em bulas de medicamentos indicados para doenças de origem bacteriana em peixes, como por exemplo, o Aquaflor®, um premix 50 % tendo o Florfenicol como princípio ativo, muito comumente utilizado em tilápias para combater septicemia hemorrágica causada por aeromonas móveis e estreptococose causada pelo *Streptococcus agalactiae*. O preconizado pela empresa produtora do Aquaflor® é que este seja incorporado com óleo de pescado ou vegetal na proporção de 0,5 – 1,0 % da quantidade de ração a ser ofertada aos peixes. Essa mistura é adicionada a ração, produzindo assim os grânulos medicados.

Em estudos de Carrachi, 2010, foram utilizados em ensaios de ecotoxicidade e eficácia, rações medicadas com oxitetraciclina (OTC). Para cada quilo de ração utilizada nesses ensaios foram acrescentadas, de forma homogênea, quantidades distintas de OTC dissolvidas em 2 % de óleo vegetal. Em seguida a ração foi mantida em temperatura ambiente por quatro dias, seguida de ensaios biológicos sem prévia quantificação do fármaco na ração.

Os lipídeos são elementos importantes e necessários na dieta de qualquer animal, pois fornecem energia necessária ao organismo. Porém, em elevadas

concentrações podem influenciar no bom funcionamento do organismo animal (Ribeiro et al., 2008). O excesso de ácidos graxos administrados aos animais durante o tratamento com rações medicadas pode ocasionar esteatose hepática com redução da velocidade máxima das reações enzimáticas, assim como o acúmulo indesejável de gordura devido à ressíntese lipídica da carcaça, alterando a composição química do filé.

Segundo estudos realizados por Ribeiro et al., 2008, tilápias alimentadas com dietas contendo óleo de oliva, milho e soja, estes que apresentam altas proporções de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, comprovaram a ocorrência de maior deposição lipídica muscular, em consequência da maior atuação das enzimas que participam dos processos de lipogênese e armazenamento lipídico, acompanhada de menores teores proteicos, em comparação com animais que receberam dietas com óleo de linhaça e de peixe, ricos em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) ômega – 3 .

Uma ração acrescida de medicamento veterinário na presença de óleo, além de apresentar problemas relacionados à lixiviação e a poluição ambiental, também causa o desbalanceamento nutricional da ração comercial.

Tendo em vista a problemática que envolve a necessidade do uso de antimicrobianos, as dificuldades encontradas durante o processo de administração dos medicamentos vinculado à ração e os escassos trabalhos relacionados a esse assunto, fica clara a necessidade de estudos que possibilitem um tratamento eficaz que reduza os riscos à saúde animal e humana, assim como minimizar o potencial impacto ambiental, concomitante ao manejo racional nos meios de produção aquícola.

## **Lixiviação de fármacos em ambientes aquáticos**

Para o tratamento de um animal doente na piscicultura, é necessário administrar o medicamento para toda a população que compartilha o mesmo ambiente. Nesse caso, durante a terapia, o fármaco fica disponível aos animais que apresentam dificuldades de se alimentar da ração por um determinado período de tempo, determinando assim uma maior predisposição as linhagens dos microorganismos resistentes. Somente a utilização de antibióticos não é suficiente, devendo ser associada às boas práticas de manejo (Klesius, 1995).

A grande maioria dos produtos farmacêuticos utilizados na piscicultura são bioacumulativos, podendo persistir no ambiente depois de longos períodos após a administração (Boyd & Queiroz, 2004). No caso dos antibióticos, eles podem causar variados efeitos tóxicos nos organismos alvo e não alvo devido ao acúmulo e persistência desses compostos influenciados pelos fatores físico químicos da água (pH, temperatura, salinidade) ou ambientais (temperatura e luz), (Ferreira, 2007).

Uma grande porcentagem de antibióticos administrados aos peixes nos mais diversos meios de produção chega ao ambiente através da ração medicada não consumida e, dessa forma, ocorre o acúmulo e a persistência desses compostos no ambiente. Daí a importância dos testes de lixiviação que servem para calcular a taxa percentual de medicamento que foi perdido no ambiente após seu desprendimento na ração.

## **Polímeros empregados em revestimentos farmacêuticos**

As principais características que o polímero utilizado durante o desenvolvimento de um produto farmacêutico deve ter, a fim de que seja obtido um revestimento ideal, incluem: a solubilidade em uma vasta opção de solventes, de forma que tenham a facilidade de produzir revestimentos com propriedades adequadas; atóxico; inerte física e quimicamente; estável ao calor, luz e umidade; que seja capaz de se ligar ao princípio ativo (Stuart, 2004).

O pH fisiológico e o tempo de esvaziamento do trato gastrointestinal dos seres vivos variam ao longo de sua extensão, sofrendo influência da alimentação. A compreensão da fisiologia do sistema digestivo é extremamente fundamental para o desenvolvimento de novos produtos, pois cada parte do organismo influencia de forma distinta as taxas de absorção do princípio ativo a ser administrado através de determinado medicamento.

A técnica de revestimento é um dos mais antigos processos farmacêuticos ainda existentes e com grande aplicabilidade em diversos segmentos, incluindo as formas farmacêuticas que permitem controlar as formas de liberação de um fármaco em um local específico (Prista et al., 2003).

As formas farmacêuticas de liberação modificada compreendem um sistema onde a liberação do fármaco é determinada de acordo com objetivos ou conveniências não oferecidas pelos sistemas de pronta liberação (USP, 2005). As formas farmacêuticas sólidas orais de liberação modificada mais comumente utilizadas na terapia humana e veterinária compreendem:

- *Liberação prolongada*, onde ocorre a liberação lenta e em quantidade constante por unidade de tempo;
- *Liberação retardada* onde há a liberação do fármaco em períodos de tempo bem definidos após a administração do medicamento;
- *Liberação com ação repetida*, onde inicialmente a dose convencional contida na parte externa do material revestido é liberada e, posteriormente, a dose incorporada em seu interior. Esta última manterá o nível plasmático efetivo idêntico à tomada de doses consecutivas de um medicamento de revestimento convencional (Veiga, 1988, USP, 2005).

Dentre os principais polímeros utilizados na indústria farmacêutica, estão os formadores de filmes simples como, por exemplo, o amido e a maltodextrina, que garantem a formação de filme por um curto período de tempo, assegurando homogeneidade do fármaco e aumentando o tempo de estabilidade do produto.

Durante o preparo dos revestimentos, o polímero é aplicado na superfície do material formando uma fina película e conferindo características benéficas em

relação à forma não revestida, incluindo a homogeneidade do princípio ativo no produto elaborado (Hogan, 1995).

Dentro dos conceitos de tecnologia farmacêutica, muitos métodos clássicos de revestimento são comumente utilizados. A USP (Pharmacists' Pharmacopeia, 2005) relacionam três diferentes métodos farmacêuticos usados para revestir cápsulas: *a técnica de revestimento no béquer*, *a técnica de imersão (dipping)* e *a técnica de vaporização (spraying)* (Allen, 2002; USP, 2005). Do ponto de vista econômico, essas técnicas são de rápido preparo, não demandando polímeros de elevado custo tão pouco o uso de equipamentos sofisticados (Aulton, 2005).

Na *técnica de revestimento no béquer*, o polímero utilizado no revestimento é aquecido brandamente até atingir o ponto de fusão. Algumas gotas do revestimento no material a ser revestido de forma lenta são incorporadas, rotacionando o béquer de maneira ininterrupta até total adesão do polímero nas paredes do material a ser revestido.

Na *técnica de imersão*, o polímero é aquecido brandamente, geralmente na presença de solventes aquosos ou orgânicos até a formação homogênea de uma solução de revestimento. Após esse preparo, o material a ser revestido é imerso até sua total molhabilidade. O material já revestido, então, segue para a secagem com ar quente ou frio, dependendo da estabilidade do fármaco presente. Repete-se o processo até que a camada formada esteja visualmente uniforme no material.

A *técnica de vaporização (aspersão ou atomização)* consiste no preparo de uma solução aquosa ou orgânica junto ao material de revestimento, que é adicionada em um frasco spray. Nesse processo, o material a ser revestido está acomodado numa betoneira ou turbina drageadeira, onde a solução é borrifada em múltiplas camadas muito cuidadosamente, simultaneamente ou não ao processo de secagem. O processo é repetido até a obtenção de um filme de revestimento adequado às características desejadas, podendo ser esse, o aumento da estabilidade, a homogeneidade do fármaco no produto final, dentre outras características (Allen, 2002).

Dentre as principais técnicas citadas acima para a formação de filmes poliméricos em escala industrial de drágeas e comprimidos, a técnica de vaporização é a mais comumente empregada por ser relativamente simples e baseia-se na pulverização dos polímeros dissolvidos em soluções aquosas e orgânicas no material a ser revestido (Bunhak, 2007).

Indiscutivelmente, a utilização de solventes aquosos se mostra muito mais segura do ponto de vista toxicológico, além de mais econômica quando comparada ao custo dos solventes orgânicos. Porém, a fase aquosa utilizada isoladamente na formação de polímeros aumenta a taxa de secagem do revestimento produzido, devido à alta energia de vaporização da água (539,4 cal/g) (Cerea et al., 2004). Por esse motivo, em muitos processos de revestimento utiliza-se concomitantemente a água e solventes de baixa toxicidade, a fim de facilitar a volatilização da solução de revestimento.

Um fator importante na escolha dos excipientes, no tipo e técnica de revestimento, é a natureza do fármaco o qual influencia significativamente na dissolução do revestimento nas diferentes formas farmacêuticas.

O PVP, por exemplo, é geralmente utilizado na área farmacotécnica como agente aglutinante (utilizado para aumentar a coesão entre pós e facilitar os processos de granulação e/ou compressão) e como agente desintegrante (facilitando a desintegração de comprimidos e cápsulas na cavidade entérica), conforme a concentração empregada na formulação. A umidade absorvida do ar pelo PVP também favorece a atuação desse polímero como agente plastificante apresentando características transparentes e resistentes (APA, 2006).

Na literatura já se encontram estudos do uso do PVP como agente aglutinante em ração destinada à piscicultura, no intuito de aumentar a estabilidade da ração na água e, conseqüentemente, minimizar a taxa de lixiviação dos componentes presentes no alimento (Hepher, 1968). Estudos de Cantelmo et al., (2002) avaliaram a presença de PVP durante o preparo de dietas para peixes, com o propósito de determinar o tempo mínimo de impermeabilização da ração em ambientes aquáticos. Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que a utilização do PVP como aglutinante melhora

significativamente a resistência física dos grânulos, aumentando o tempo de flutuação e estabilidade física dos péletes.

Possíveis alternativas para os problemas relacionados à administração de medicamentos veterinários para peixes, sem alterar drasticamente as características nutricionais do alimento e garantir a saúde do animal é a utilização da técnica de revestimento, na presença de polímeros, para incorporar o fármaco na ração. Esse procedimento minimiza, ainda, o potencial impacto ambiental causado nos meios de produção tanto pela ração como pelo fármaco lixiviado.

### **Métodos de determinação de fármacos veterinários em alimentos**

Quantificar a presença de medicamentos em amostras requer metodologias específicas de análise. Existem alguns métodos oficiais disponíveis para determinadas substâncias e matrizes que devem ser seguidos. Quando não existem, faz-se necessário o desenvolvimento ou adaptação de outras metodologias já existentes na literatura.

O desenvolvimento desses métodos tem como base fundamental a confiabilidade nos resultados e para garantir tal resultado, a metodologia utilizada precisa gerar informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ou seja, fornecer evidências objetivas de que os requisitos para uma aplicação ou usos específicos pretendidos serão atendidos (INMETRO, 2003).

A técnica de separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) associada à detecção por fluorescência, detecção por arranjo de diodos ou espectrometria de massas, vem se destacando na química analítica pela capacidade de realizar análises quantitativas e qualitativas em matrizes ambientais, biológicas, farmacêuticas e em alimentos.

No Brasil, os procedimentos de validação adotados baseiam-se em guias disponibilizados por órgãos credenciados nacionais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2003) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2010).

Segundo o guia de validação de procedimentos analíticos e controle de qualidade para medicamentos veterinários, fitofármacos, fármacos e outras substâncias em produtos para alimentação animal e matrizes de origem biológica (MAPA, 2010), o procedimento analítico pode ser classificado em diferentes categorias, de acordo com sua finalidade. A partir dessa classificação, determinam-se os parâmetros mínimos de desempenho analítico que deverão ser utilizados durante a execução da validação. Os parâmetros estão descritos nas Tabelas 7 e 8.

**Tabela 7:** Classificação dos ensaios da validação analítica, segundo sua finalidade.

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos, matérias primas, ração e matrizes de origem biológica.
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias primas.
III	Testes de desempenho (Ex: dureza, friabilidade, viscosidade).
IV	Testes de identificação.

FONTE: MAPA, 2010.

**Tabela 8:** Parâmetros estudados na validação analítica de acordo com a finalidade e categoria

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Ensaio Limite	Teste Quantitativo		
Seletividade	sim	sim	sim	*	sim
Linearidade	sim	sim	não	*	não
Precisão	sim	sim	não	sim	não
Limite de Detecção	*	não	sim	*	não
Limite de Quantificação	*	sim	não	*	não

\* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

FONTE: MAPA, 2010 - Adaptado.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aquicultura vem se destacando ao longo dos anos, devido ao aumento da demanda mundial por alimentos de alto valor nutricional. As características climáticas e geográficas do Brasil, assim como a elevada disponibilidade de grãos produzidos essenciais para a elaboração de rações, proporcionam ao país uma excelente oportunidade de inserção no comércio mundial desses produtos, principalmente no mercado nacional onde o aumento da procura por pescados tem crescido ultimamente.

Por conta da intensificação da produção aquícola, e conseqüente aumento na densidade populacional na produção, os animais vivem em constante condição de estresse, onde nem sempre a adoção de boas práticas de manejo é utilizada para impedir o aparecimento de surtos infecciosos que refletem em perdas econômicas significativas aos produtores.

Para combater as principais doenças nos distintos meios de produção, muitos antimicrobianos são utilizados, de maneira inadequada, incluindo a ENR, uma fluorquinolona que possui amplo espectro de ação contra inúmeras bactérias patogênicas.

Os fármacos, quando adicionados a ração de forma inadequada, como, por exemplo, quando utilizadas em banhos de óleo, podem se desprender do pélete durante o período de tratamento e lixiviar para o ambiente. Outro problema sério que ocorre com o uso de óleo vegetal durante o tratamento com ração medicada, é que a presença desse óleo causa desbalanceamento das rações que podem levar a esteatose hepática nos animais e, como consequência, reduzir os níveis de proteína nos filés.

Uma possível alternativa para minimizar a lixiviação desses fármacos no ambiente e garantir uma homogeneidade de dose durante o tratamento destes animais são os revestimentos. Existem diversas formas farmacêuticas que permitem controlar a liberação de um fármaco em um determinado local específico, além de garantir aumento de estabilidade do mesmo no pélete revestido. Após o preparo da ração medicada, é necessário garantir que o princípio ativo esteja presente na ração numa concentração estabelecida a priori, através de métodos específicos e previamente validados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29/05/2003**. Brasil, 2003. Disponível em < [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)>. Acesso em agosto de 2012.
- ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet. **RDC nº 253, de 16/09/2003** Brasília. Brasil, 2003. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>>. Acesso em agosto de 2012.
- APA. American Pharmaceutical Association. **Handbook Pharmaceutical Excipients**. Washington, 2006.
- ARANA, L.V. **Aqüicultura e Desenvolvimento Sustentável**. Editora UFSC. 310p. 1999.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Artmed, Porto Alegre, 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.
- BEVERIDGE, M.C.M.; PHILLIPS, M.J. Environmental impact o tropical inland aquaculture. In: PULLIN, R.S.V.; ROSENTHAL H.; MACLEAN, J.L. (Eds.) **Environment and aquaculture in developing countries**. Metro Manila, Philippines International Center for Living Aquatic Resources Management, p.213-236. 1993.
- BOTSOGLOU, N. A.; FLETOURIS, D. J. **Drug Residues in Foods**, Pharmacology, Food Safety, and Analysis. Marcel Dekker, New York. 2001.

- BOYD, C. E. ; QUEIROZ, J. F. Manejo das condições do sedimento do fundo e da qualidade da água e dos efluentes de viveiros. In CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D. M. et al. (Eds.) **Tópicos especiais e piscicultura de água doce tropical intensiva**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. p.25-43. 2004.
- BOWSER, P.R.; WOOSTER, G.A.; STLEGER, J.; BABISH, J.G., Pharmacokinetics of enrofloxacin in fingerling rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. 15, 62–71. 1992.
- BUFFÉ, C; ARAÚJO, B. V.; DALLA COSTA, T. Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos na otimização de terapias antimicrobianas. **Caderno de Farmácia**. v. 17, n. 2, 97-109p. 2001.
- BUNCH, E. C.; BEJERANO, I. The effect of environmental factors on the susceptibility of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* to streptococcosis. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v.49, n.2, p.67-76. 1997.
- BUNHAK, E.J. et al. Influência do sulfato de condroitina na formação de filmes isolados de polimetacrilato: avaliação do índice de intumescimento e permeabilidade ao vapor d'água. **Química Nova**, 30 (2): 312-317. 2007.
- BUSS, D.F. Proteção à vida aquática, participação das comunidades e políticas de recursos hídricos. **Ciência & Ambiente** v.25, p.71-84. 2002.
- CARRACHI, S. P. **Ecotoxicidade e eficácia da oxitetraciclina e do florfenicol contra infecção experimental por *Aeromonas hydrophila* e aspectos histopatológicos em pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2010. 78f. Dissertação (Mestrado). Centro de Aquicultura da UNESP – Universidade Estadual Paulista Campus Jaboticabal, Jaboticabal, 2010.
- CARNEIRO, M. H.; CASTRO, P. M. G. DE. Macrodon ancylodon (Bloch & Schneider, 1801) (Estoque Sudeste) IN: Rossi-Wongtschowski, C.L.D.B. (Org.) **Análise das principais pescarias comerciais do sudeste-sul do Brasil:**

- Dinâmica Populacional das Espécies em Exploração.** Programa REVIZEE/MMA/SECIRM/FEMAR. São Paulo, p.81-87. 2005.
- CANTELMO, O. A.; PEZZATO L. E.; BARROS, M. M.; PEZZATO, A. C. Características físicas de dietas para peixes confeccionadas com diferentes aglutinantes. **Acta Scientiarum.** Maringá, v. 24, n. 4, p. 949-955, 2002.
- CEREA, M. et al. A novel powder coating process for attaining taste masking and moisture protective films applied to tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, 279: 127–139. 2004.
- CIPRIANO, R. C. ***Aeromonas hydrophila* and motile aeromonas septicemias of fish.** Fish Disease Leaflet. United States Department of the Interior. Fish and Wildlife Service Division of Fishery Research Washington, 68, 2001.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Resíduos de medicamentos veterinários en los alimentos.** 2ed, v. 3, Roma: Codex Alimentarius, 1993.
- CYRINO, J. E. P.; BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y. ;BORGHESI, R. ; DAIRIKI, J. K. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, (supl. especial) v.39, p.68-87, 2010.
- DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 637-646. 2007.
- DOOLEY, J. S. G.; TRUST, T. J. Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* virulent for fish: identification of an S-layer protein. **Journal of Bacteriology**, v.170, p. 499-506, 1988.
- EC. Decision 2002/657. (2002). Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, L221, p 8–36. 2002.

EEC. European Economic Commission Council Directive. nº. 82/2001. Directive of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products. **Official Journal of the European Communities**, No. L 311, p. 0001-0066. 2001.

EMA. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. **Enrofloxacin, extension to all food producing species**. Summary report (5), EMA/MRL/820/ 02-FINAL. 2002.

EMA. **The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products**. 2008. Disponível em: <[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits-Report/2009/11/WC500014151.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits-Report/2009/11/WC500014151.pdf)>. Acesso em agosto de 2011.

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). **Summary of evaluations performed by the joint** FAO/WHO expert committee on food additives. Enrofloxacin. 1997 <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v39je06.htm>. Acesso dia 10 de julho de 2010.

FAO/OIE/WHO. Report of a Joint FAO/OIE/WHO Expert **Consultation on Animicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance**. Issued by the World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Organisation for Animal Health. Seoul, Republic of Korea. 2006.

FERREIRA, C.S.G.; NUNES, B.A.; HENRIQUES-ALMEIDA, J.M.M.; GUILHERMINO, L. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 452–458, 2007.

FIRETTI, R.; GARCIA, S.M.; SALES, D.S. **Planejamento estratégico e verificação de riscos na piscicultura**. Disponível em:

<[http://www.infobibos.com/Artigos/2007\\_4/Planejamento/Index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2007_4/Planejamento/Index.htm)> Acesso em maio de 2011.

HARRIS, J.; BIRD, D.J. Modulation of the fish immune system b hormones. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v.77, p.163-176. 2000.

HENRY-SILVA, G.G. **Utilização de macrófitas aquáticas flutuantes (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*) no tratamento de efluentes de piscicultura e possibilidades de aproveitamento da biomassa vegetal**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2001. 56p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Estadual Paulista. 2001.

HEPHER, B. A modification hastings method of the determination of the water stability of fish feed pellets. *In* European Irland Fishing Advisor Comm., 5 Rome. **Anais...** Rome: EIFAC, 1968. p. 98., 1968.

HOGAN, J. **Revestimento de comprimidos e multiparticulados**. In: **AULTON, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas**, 2. ed., Artmed: Porto Alegre 677 p. 2005.

IMMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008. 2003.

JECFA. **Joint Expert Committee on Food Additives: 2007**. Disponível em <<http://jecfa.ilsa.org/section1.htm#1>>. Acesso em agosto de 2010.

JENEY, Z. S.; JENEY, G. Recent achievements in studies on diseases of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, v.129, p.397-420. 1995.

KIROV, S.M.; TASSELL, B.C.; SEMMLER, A.B.T.; ODOVANO, L.A.; RABAAN, A.A.; SHAW, J.G. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 547-555. 2002.

- KLESZIUS, P.; ROGERS, W. Parasitisms of catfish and other farm raised food fish. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.207, p.1473-1478. 1995.
- LEWBART, S; VADEN, J.; DEEN. C.; MANAUGH, D.; WHITT, A.; DOI, T.; SMITH, K.; Flammer Pharmacokinetics of enrofloxacin in red pacu (*Colossoma brachypomum*) after intramuscular, oral and bath administration **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 20, pp. 124–128. 1997.
- LUCCHETTI, D.; FABRIZI, L.; GUANDALINI, E.; PODESTA, E.; MARVASI, L; ZAGHINI, A.; CONIL, E. Long depletion time of enrofloxacin in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 48, pp. 3912–3917. 2004.
- MACMILLAN, J. Infectious diseases. In: TUCKER, C. S. (Ed.). **Channel catfish culture**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, p. 405-496. 1985.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 9, de 30/03/2007**. Ementa: Aprova os Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carne (Bovina, Aves, Suína e Eqüina), Leite, Mel, Ovos e Pescado do exercício de 2007. Publicada no Diário Oficial da União em 04/04/2007, Seção 1, Página 7. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/>>. Acesso em março de 2011.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 8, de 29/04/2010**. Ementa: Aprova os Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carne (Bovina, Aves, Suína e Eqüina), Leite, Mel, Ovos e Pescado do exercício de 2010. Disponível em <[http://members.wto.org/crnattachments/2010/sps/BRA/10\\_2156\\_00\\_x.pdf](http://members.wto.org/crnattachments/2010/sps/BRA/10_2156_00_x.pdf)>. Acesso em agosto de 2012.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº527, de 15/08/1995**. Ementa: Atribui ao Secretário de Defesa Agropecuária a

responsabilidade de coordenar a execução do PNCRB. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16313>>. Acesso em agosto de 2012.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº577, de 27/12/2010. **Guia de Validação de Procedimentos Analíticos e Controle de Qualidade - Medicamentos Veterinários, Farmoquímicos, Fármacos e outras Substâncias em Produtos para Alimentação Animal e Matrizes de Origem Biológica.** Disponível em [ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpssp/bibliote/informe\\_eletronico/2011/iels.jan.11/lel\\_s06/U\\_PT-MAPA-SDA-577\\_271210.pdf](ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpssp/bibliote/informe_eletronico/2011/iels.jan.11/lel_s06/U_PT-MAPA-SDA-577_271210.pdf)>. Acesso em agosto de 2012.

MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; SILVA, C.A.H.; SCHALCH, S.H.C. Parasitic infections in cultivated freshwater fishes. A survey of diagnosticated cases from 1993 to 1998. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, n.1, p.23-28. 2000.

MARTINSEN B.; HORSBERG T.E.; BURKE M. Multiple-dose pharmacokinetic and depletion studies of sarafloxacin in Atlantic salmon, *Salmo salar* L **Journal of Fish Diseases**., 17, pp. 111–121. 1994.

MDCI. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior.** Via Internet. 2012. Disponível em <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em agosto de 2012.

MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; TOMÁS, J. M. Emerging pathogens: *Aeromonas spp.* **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.157-168. 1985.

MIDLEN, A.; REDDING, T. A. **Environmental Management for Aquaculture.** Kluwer Academic Publishers, London: 215pp. 1998.

- MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim **estatístico da pesca e aquicultura. Brasil 2010.** Disponível em <<http://www.mpa.gov.br/imprensa/noticias/300-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2010>>. Acesso em agosto de 2012.
- MPA. Ministerio da Pesca e Aquicultura. **Mais Pesca e Aquicultura: Plano de Desenvolvimento Sustentável.** Brasil, 2010. Disponível em: [http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Jonathan/mais%20pesca%20eaquicultura/Carilha\\_SEAP\\_final.pdf](http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Jonathan/mais%20pesca%20eaquicultura/Carilha_SEAP_final.pdf). Acesso em agosto de 2011.
- MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Informações e Estatística. Macroindicadores.** Brasil, 2009. Disponível em <<http://www.mpa.gov.br/>>. Acesso em dezembro de 2009.
- ONO, E. A.; KUBITZA, F. **Cultivo de peixes em tanques-rede.** 3ªed. Jundiaí: Eduardo A. Ono. 112p. 2003.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: O desafio é crescer.** Brasília. 276p. 2008.
- PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento.** Maringá: Ed. da Universidade Estadual de Maringá. 305 p. 2002.
- PILARSKI, F.; ROSSINI, A. J.; CECCARELLI, P. S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al., 2002) from four tropical fish species in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 631-637. 2008.
- PRISTA, L.N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; LOBO, J.S. **Comprimidos Revestidos.** In: Tecnologia Farmacêutica. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2003.
- RIBEIRO, P. A. P. LOGATO, P. V. R.; PAULA, D. A. J; COSTA, A. C.; MURGAS, L. D. S.; FREITAS, R. T. F. Efeito do uso de óleo na dieta sobre a lipogênese e

- o perfil lipídico de tilápias-do-Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.37, n.8, p.1331-1337. 2008.
- SAMUELSEN, O B. Pharmacokinetics of quinolones in fish: a review. **Aquaculture.** ;255(1–4):55–75. 2006.
- SOLTANI, M.; MUNDAY, B. L.; BURKE, C. M. The relative susceptibility of fish to infections by *Flexibacter columnaris* and *Flexibacter maritimus*. **Aquaculture**, v.140, p. 259-264. 1996.
- STOFFREGEN, D.A.; WOOSTER, G.A.; BUSTOS, P.S.; BOWSER, P.R.; BABISH, J.G. Multiple route and dose pharmacokinetics of enrofloxacin in juvenile Atlantic salmon **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.**, 20, pp. 111–123. 1997.
- STUART, P.C. **Revestimento de formulações farmacêuticas.** 923-932p. In: REMMINGTON, G.A.R. A ciência e a prática farmacêutica, 20. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2208 p. 2004.
- SURESH, A. V. Tilapia Update 1998. **World Aquaculture**, v.30, n.4, p.8-68. 1998.
- TACON, A.G.J. Salmon aquaculture dialogue: Status of informatio on salmon aquaculture feed and the environment. **Aquafeel International**, v.8, p.22-37. 2005.
- TACON, A.G.J.; FORSTER, I.P. Aquafeeds and the environment policy implications. **Aquaculture**, v.226, p.181-189. 2003.
- THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. **Journal Plant Nutrition Soil Science**, v. 166, p. 145-167. 2003.
- Thoma, K., Bechtold, K. Enteric coated hard gelatine capsules. **Capsugel Technical Bulletin**, 1992;
- USP Pharmacist’s pharmacopeia. 28. ed. **Rockville: The United States Convention.**.. 3187 p. ,2005.

- URBINATI, E.C., CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI E.C.; FRACALOSSO, D.M. et al. (Eds.) Tópicos especiais e piscicultura de água doce tropical intensiva. Jaboticabal **Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática**, p.171-193. 2004.
- VALENTI, W.C. **Aqüicultura no Brasil; bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia. 399p. 2000.
- VEIGA, F. J. B. Medicamentos orais de liberação controlada: comprimidos matriciais hidrofílicos. **Boletim da Faculdade de Farmácia de Coimbra**, Coimbra, v. 12, n. 2, p. 17-87. 1988.
- VIVAS, J.; CARRACEDO, B.; RIAÑO, J.; RAZQUIN, B. E.; LÓPEZ-FIERRO, P.; ACOSTA, F.; NAHARRO, G.; VILLENA, A. J. Behavior of an *Aeromonas hydrophila* live vaccine in water microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p.2702-2708. 2004.
- WAKABAYASHI, H.; EGUSA, S. Preliminary experiments on environmental factors influencing the prevalence of columnaris disease. **Fish Pathology**, v.7, p.58-63. 1972.
- WHO, 2004 World Health Organization, and Food and Agriculture. **Workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: scientific assessment**. Geneva, Sw, 1-5. December 2004.  
<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/report.pdf>

## **CAPÍTULO II**

### **INCORPORAÇÃO DE ENROFLOXACINA EM RAÇÃO PARA PEIXES: ESTUDO DE TÉCNICAS DE REVESTIMENTO E AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE LIXIVIAÇÃO DO FÁRMACO EM AMBIENTES AQUÁTICOS**

**Capítulo a ser submetido para publicação na Revista Brasileira de Zootecnia**

## RESUMO

Um método de revestimento simples, rápido e de baixo custo foi desenvolvido para incorporar enrofloxacina (ENR) na ração destinada ao tratamento de animais doentes na piscicultura. Para avaliar a perda do medicamento revestido durante a exposição da ração medicada em ambientes aquáticos, foi realizado um planejamento experimental fracionário ( $2^{4-1}$ ) sendo avaliado o efeito das variáveis tempo, temperatura, pH e concentração de polímero no processo de lixiviação da ENR para a água. Foi desenvolvido e validado método analítico para a determinação dos níveis de ENR na ração, antes e após os testes de lixiviação. O método foi validado através da determinação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, faixa linear, precisão (intracorrída e intercorrídas), exatidão (teste de recuperação), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), considerando o guia de validação da Agência Nacional de vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2010). As rações revestidas, por aspersão, apresentaram homogeneidade no teor de ENR (CV menor que 4,42 %). O revestimento da ração medicada tanto com 0,5 % quanto com 2,0 % de PVP reduziu a taxa de lixiviação da ração, porém essa taxa de redução depende significativamente ( $p > 0,05$ ) da temperatura e do tempo de permanência da ração na água.

**Palavras chave:** piscicultura, medicamentos veterinários, ração medicada, enrofloxacina, lixiviação de fármacos.

## ABSTRACT

A method of coating a simple, fast and low cost has been developed to incorporate Enrofloxacin (ENR) in the diet for the treatment of sick animals in fish farming. To evaluate the loss of the drug coated during exposure of medicated feed on aquatic environments, we performed a fractional factorial design ( $24^{-1}$ ) and evaluated the effect of the variables time, temperature, pH and polymer concentration in the leaching process to ENR water. Was developed and validated analytical method for the determination of levels of ENR in the diet, the tests before and after leach. The method was validated by determining the following parameters: selectivity, linearity, linear range of application, precision (intra-day and inter-day), accuracy (recovery test), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), considering the guide validation of the National Health Surveillance Agency (ANVISA, 2003) and the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA, 2010), diets coated by spraying, exhibited homogeneity content ENR (CV less than 4.42%). The coating of both medicated feed 0.5% to about 2.0% PVP reduced the leaching rate of feed, however the rate of reduction depends significantly ( $p < 0.05$ ) on the temperature and the residence time of the feed in the water.

**Keywords:** fish farming, veterinary medicines, medicated feed, enrofloxacin, leaching of drugs.

## INTRODUÇÃO

Na piscicultura, o uso de medicamentos veterinários é comumente utilizado para assegurar lucros nos sistemas intensivos de produção. No entanto, devido à falta de legislação específica e a baixa disponibilidade de medicamentos veterinários regulamentados, muitos produtores utilizam outros medicamentos de forma indiscriminada para combater as infecções bacterianas que acometem os peixes, principalmente a streptococose, causadas pelo *Streptococcus*, a columnariose, causada pela *Flavobacterium columnare* e a septicemia hemorrágica causada pela *Aeromonas hydrophila*. O uso indevido desses produtos coloca em risco toda a cadeia produtiva, causando a riscos ambientais e de saúde pública (Carneiro et al., 2005).

A enrofloxacin (ENR), um antibiótico da família das fluoquinolonas, é largamente utilizada na aquicultura devido a sua eficácia no tratamento das principais doenças de peixes e, por não ser regulamentada em alguns países, inclusive no Brasil, sua aplicação para o tratamento desses animais é considerada ilegal (Samuelson, 2006; Lucchetti et al., 2004).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu o LMR de  $100\mu\text{g kg}^{-1}$  para a soma dos resíduos de ENR e seu composto de biotransformação, a ciprofloxacina (CIP) apenas para fins de fiscalização, visto que esse medicamento não está legalizado para o uso na piscicultura.

Durante o período em que os animais estão acometidos por doença bacteriana, algumas dificuldades são evidentes, tais como a falta de apetite, ou seja, demora desses animais em se alimentar, aumentando o tempo de permanência da ração nos ambientes aquáticos, o que favorece a perda do medicamento para o meio, dificultando a eficácia deste tratamento na dose correta para os peixes. A presença de resíduos medicamentosos disponíveis tanto no pescado quanto no meio de produção representa riscos à saúde humana devido à sua toxicidade, assim como potencial impacto ambiental e constitui entrave à exportação.

O que se observa comumente nas propriedades rurais é a administração do antimicrobiano na ração através do processo de banhos de óleo ou aplicados diretamente na água dos viveiros. A administração via ração é preferível quando comparado ao fornecimento do fármaco diretamente na água, pois somente a quantidade necessária do medicamento utilizada durante o tratamento fica disponível no meio, reduzindo o resíduo gerado ao ambiente (Ferreira et al., 2007). Alguns tipos de preparo são específicos para sistema de produção, tipos de tratamento e espécie de animal e as fábricas de ração destinadas a piscicultura ainda não dispõem de tecnologia que incluam o antibiótico, ou outro medicamento veterinário antes do processo de extrusão ou peletização.

Uma possível alternativa para administrar a ENR aos animais via ração de forma homogênea, minimizando os problemas relacionados à concentração errônea de dose ou perdas durante o armazenamento e administração, são os revestimentos com polímeros.

Muitas são as vantagens desse tipo de revestimento em comprimidos e drágeas na indústria farmacêutica, como por exemplo, o aumento de estabilidade devido à elevada proteção do princípio ativo aos agentes externos, principalmente ar, luz e umidade. Essa técnica farmacêutica de revestimento ainda é pouco difundida na elaboração de ração medicada.

Assim, o presente capítulo teve como objetivos o estudo e desenvolvimento de um revestimento pelo processo de aspersão na ração destinada à aquicultura, visando garantir a homogeneidade da dosagem da ENR adicionada, favorecendo o tratamento efetivo das principais bacterioses que acometem os sistemas de produção e reduzindo as perdas do fármaco durante o período de tratamento. Para tanto, foram realizados testes de lixiviação da ração medicada em ambientes aquáticos a partir de um planejamento fatorial fracionado para avaliar os fatores de significância do tempo, temperatura, pH e concentração de polímero no processo de perda do princípio ativo presente na ração e o desenvolvimento e validação de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) para quantificar a ENR na ração medicada.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Padrão analítico, solventes e polímeros**

O padrão analítico empregado nesse trabalho foi a ENR adquirida da Fluka analytical – Sigma Aldrich (China) com pureza superior a 98 %. A ENR utilizada na elaboração das rações medicadas foi doada pela Desvet (Desvet medicamentos veterinários) com pureza superior a 98 %.

A acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) empregados nas análises cromatográficas foram de grau HPLC, adquiridos junto a J.T. Baker (Philipsburg, EUA). O ácido fórmico foi adquirido da Acros Organic (New Jersey, EUA), o ácido acético glacial da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o álcool etílico absoluto da Labsynth (São Paulo, Brasil), todos de grau analítico. A água utilizada foi purificada no sistema Simplicity da Millipore (Massachusetts, USA).

Os polímeros utilizados foram: amido de milho e gelatina farmacêutica da Natural Farma (São Paulo, Brasil), maltodextrina da Neo Pharmex (São Paulo, Brasil) e polivinilpirrolidona (PVP – K30) da Henrifarma (São Paulo, Brasil),

### **Amostra de ração**

A ração utilizada nos ensaios de revestimento foi da Marca Guabi Pirá (Campinas, Brasil) extrusada, apresentando 28 % de proteína bruta em sua formulação e diâmetro na faixa entre 4 a 6 mm, ideal para a ingestão de 1 % do peso animal corpóreo. Porções de 100 g de ração foram armazenadas em sacos de polipropileno e refrigeradas a -20 °C até o momento dos ensaios.

### **Equipamentos**

As análises cromatográficas foram realizadas em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência composto por sistema quaternário de bombas, injetor automático e forno de aquecimento de coluna da Waters Alliance, modelo 2695

(Massachusetts, EUA), e sistema de detecção por arranjo de diodos (DAD) Waters Alliance, modelo 2996. (Massachusetts, EUA). A aquisição de dados foi realizada mediante o programa computacional Waters Empower™, versão 3.0 Para o revestimento da ração foi utilizada uma betoneira de bancada Mobilgear, modelo Mobil 636 (Lancashire, Reuni Unido), utilizando-se um pulverizador manual com gatilho de jato regulável e capacidade de 450 mL, marca Vonder (São Paulo, Brasil).

Outros equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho foram: balança semianalítica Ohaus, modelo Adventurer ARD110 (São Bernardo do Campo, Brasil), balança analítica Mettler, modelo AE163 (São Bernardo do Campo, Brasil), banho ultrassônico Unique, modelo Cleaner USC 2850 (São Paulo, Brasil), centrífuga microprocessada Cientec, modelo 5500 D (Piracicaba, Brasil), Ultraturrax Ika, modelo T10 (Artur Nogueira, Brasil), secador NKS, modelo TS-832 (São Paulo, Brasil), pHmetro Analyser, modelo pH 300 (São Paulo, Brasil), agitador de tubo Phoenix tipo vórtex, modelo AP56 (Araraquara, Brasil), banho refrigerado Tecnal, modelo TE184 (Piracicaba, Brasil), estufa Fanen, modelo 515 (São Paulo, Brasil) e estufa a vácuo Equaterm, modelo 299-751 (São Paulo, Brasil).

## **Preparo das soluções**

### *Solução Padrão*

A solução estoque de enrofloxacin foi preparada na concentração de 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em metanol, dissolvendo-se 10mg de enrofloxacin em 25 mL de metanol, armazenada em frasco âmbar, mantida em freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) e utilizada durante o período de um mês. As soluções intermediárias utilizadas na construção da curva analítica foram preparadas diariamente e obtidas a partir de diluições sucessivas da solução estoque em água ultrapura na faixa entre 1,13 a 11,29  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### *Solução de revestimento*

A solução de revestimento foi preparada com 120 mg de ENR dissolvida em 21 mL de ácido acético glacial 1 %. Após solubilização da ENR foi adicionado o polímero em concentrações variadas durante o estudo e por fim, acrescidas de 9,0 mL de álcool etílico absoluto. A concentração de ENR foi estabelecida considerando 20 % de possíveis perdas durante o processo de revestimento.

### **Preparo da ração medicada**

#### *Processos de revestimento da ração medicada*

Baseando-se nas técnicas de revestimento magistral, foi utilizado o método de aspersão (Allen, 2002; USP PHARMACISTS PHARMACOPEIA, 2005), variando-se a quantidade de camadas de revestimento, tipos e concentrações de diversos polímeros.

Para a técnica de aspersão empregada no revestimento da ração, utilizou-se a betoneira de bancada operando com rotação de 800 rpm. A aspersão da solução de revestimento foi realizada com o pulverizador manual em ritmo constante até o final da aplicação. Concomitantemente, o solvente foi volatilizado com ar aquecido a 50 °C, utilizando o secador NKS. A Figura 1 apresenta fotos do sistema empregado.



**Figura 1.** Sistema de revestimento da ração por aspersão (A) vista frontal e (B) vista lateral.

## **Análises realizadas na ração medicada**

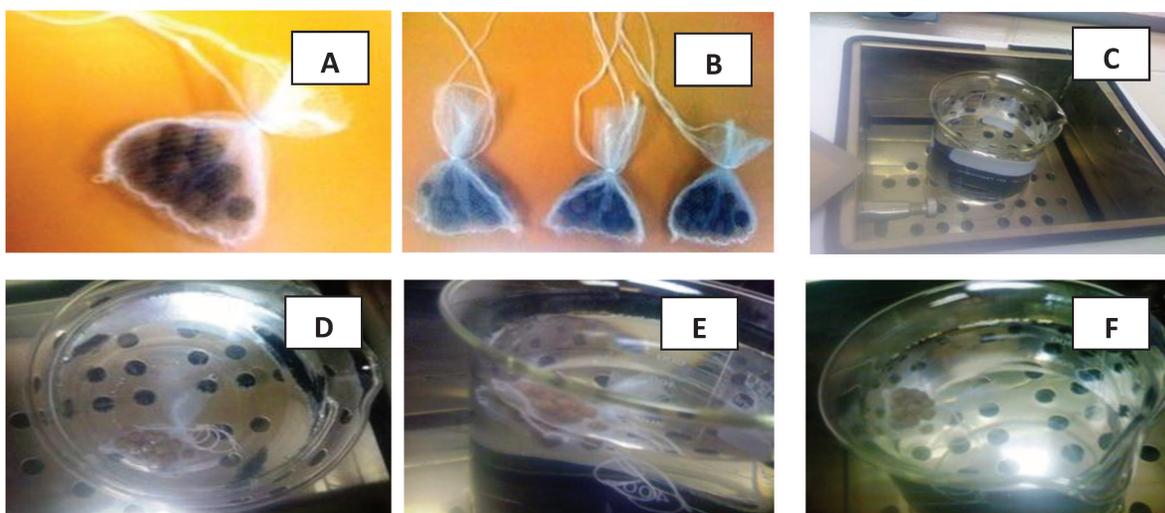
### *Determinação do teor de umidade*

A determinação de umidade das rações revestidas foi realizada conforme o método oficial para determinar umidade em alimentação animal 934.01 (AOAC, 2000), empregando do 1,0 g de ração. O procedimento foi realizado em triplicata.

### *Testes de lixiviação da ração medicada*

O método empregado na avaliação da lixiviação da ração foi baseado no trabalho de Soares (2000). Para cada tratamento, pesou-se analiticamente cerca de 1,0 g de ração medicada com teor e umidade conhecidos. Os grânulos foram acomodados em saquinhos de nylon com orifícios de 1 mm, fechados com barbante e previamente tarados. Esses saquinhos foram imersos em béqueres de vidro contendo 1 litro de água destilada e submetidos a diferentes condições de tempo e temperatura. Decorrido o período do ensaio, as amostras foram retiradas da água, drenadas e secas em estufa a vácuo a 50 °C, até peso constante. Essas amostras foram mantidas em dessecador até o momento da análise cromatográfica, por um período menor que 24 h.

A Figura 2 apresenta fotos do sistema empregado para avaliação da taxa de lixiviação da ração medicada.



**Figura 2.** Teste de lixiviação da ração medicada. (A e B) acomodação da ração em saquinhos de nylon, (C, D, E e F) ensaios de lixiviação com controle de tempo, pH e temperatura.

## **Determinação de enrofloxacin**

### *Conformidade do sistema analítico*

A determinação do teor de enrofloxacin na ração medicada foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

A coluna analítica utilizada foi uma monolítica RP 18 de 100 x 3 mm Merck® (Darmstadt, Alemanha). A temperatura de operação do forno foi de 40° C.

O Eluente foi composto por 0,1 % ácido fórmico / acetonitrila (92:8, v/v) de maneira isocrática, com vazão de 1,5 mL min<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi de 20 µL; e a detecção em 280 nm.

### *Preparo de amostra*

Foi utilizada 1,0 g da ração, equivalente a 15 grânulos, inicialmente extraída com 10,0 mL de uma mistura contendo solução de ácido fórmico 1 % e acetonitrila na proporção 70:30 v/v (solução extratora) em tubo falcon de 20,0 mL. O rompimento e homogeneização dos péletes se deu através da utilização do dispersor ultraturrax por 1 min, após o que a amostra foi colocada em banho de ultrassom por 5 min. Sequencialmente, a amostra foi centrifugada a 2800 g durante 5 min. Para garantir a extração exaustiva da amostra, esse procedimento foi repetido por mais uma vez e os sobrenadantes agrupados em balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com a solução extratora. Essa solução foi diluída numa proporção 1:10 v/v em água Milli Q, e filtrada em membrana de 0,22 µm antes da injeção no cromatógrafo a líquido.

### *Validação do método analítico*

O método analítico desenvolvido para a determinação de ENR na ração medicada foi validado seguindo as recomendações do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (ANVISA, 2003) e o Guia de Validação de Procedimentos Analíticos e Controle de Qualidade – Medicamentos Veterinários, Farmoquímicos, Fármacos e outras Substâncias em Produtos para Alimentação Animal e Matrizes de Origem Biológica (MAPA, 2010).

Os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade, faixa linear, precisão (intracorrida e intercorridas), exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. A forma utilizada para se avaliar foi à comparação da matriz isenta da substância de interesse (branco) com a matriz adicionada de ENR (n=10).

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância estudada dentro de uma determinada faixa de aplicação ou intervalo linear. O resultado da linearidade foi expresso pelo coeficiente de correlação (r), a partir da curva analítica preparada em solvente. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99 para evidência da linearidade do método (ANVISA, 2003).

A precisão do método representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes e repetidos de uma mesma amostra e foi avaliada em condições de repetibilidade, ou seja, análise realizada no mesmo dia, pelo mesmo analista e mesmo equipamento (precisão intracorrida) e de reprodutibilidade, ou seja, análise realizada em 3 dias consecutivos pelo mesmo analista e mesmo equipamento (precisão intercorridas). Os resultados da precisão foram expressos através do coeficiente de variação (CV, %) dos resultados obtidos com 7 replicatas utilizando-se a ração medicada. O guia de validação da ANVISA (2003) recomenda que em condições de precisão intra e intercorridas o valor de CV não deva exceder 5,0 %.

A exatidão do método foi avaliada mediante o ensaio de recuperação utilizando-se rações fortificadas com ENR em 3 níveis de concentração

correspondentes a 50, 100 e 150 % do valor esperado, o que correspondeu à concentrações de 600, 1200 e 1800 mg kg<sup>-1</sup> de ENR. Os resultados foram expressos como a porcentagem de recuperação utilizando-se a seguinte equação:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{ENR_{enc}}{ENR_{add}} \times 100$$

Onde,

$ENR_{enc}$  = concentração de ENR determinada na ração fortificada ( $\mu\text{g g}^{-1}$ );

$ENR_{add}$  = concentração de ENR adicionada na ração branco, ou seja, a fortificação da ração expressa em  $\mu\text{g g}^{-1}$ ;

O guia de validação do MAPA (2010) admite uma faixa de variação da porcentagem de recuperação de 97 a 103 % para substâncias na concentração de 1000 mg kg<sup>-1</sup>.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para a ENR foram determinados através da relação entre sinal e ruído da linha de base. Para o limite de detecção, a relação utilizada foi de três vezes a área do sinal em relação ao ruído da linha de base. Para o limite de quantificação, a relação foi de dez vezes (MAPA, 2010).

### **Planejamento experimental**

A partir da escolha do PVP como polímero de revestimento foi realizado um planejamento experimental do tipo fracionário 2<sup>4-1</sup> com o objetivo de avaliar as variáveis mais importantes no ensaio de lixiviação. As variáveis com as respectivas faixas estudadas selecionadas para o estudo foram: pH (7,0 e 7,8), temperatura da água (22 e 28 °C), tempo de permanência de ração na água (5 e 30 min) e a concentração do polímero (0,5 e 2,0 %). A resposta avaliada no planejamento experimental foi a porcentagem de lixiviação do fármaco.

Na Tabela 1 são apresentadas as condições experimentais dos ensaios realizados.

**Tabela 1.** Condições experimentais do ensaio de planejamento experimental fracionário 2<sup>4-1</sup>.

Ensaio	Variáveis estudadas			
	Temperatura (°C)	PVP <sup>1</sup> (%)	Tempo (min)	pH
01	28	2,0	30	7,8
02	28	2,0	5	7,0
03	28	0,5	30	7,0
04	28	0,5	5	7,8
05	22	2,0	30	7,0
06	22	2,0	5	7,8
07	22	0,5	30	7,8
08	22	0,5	5	7,0

<sup>1</sup> PVP = polivinilpirrolidona.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Estudos preliminares para obtenção da ração medicada

A incorporação da ENR na ração foi realizada a partir do preparo de uma solução contendo o fármaco e polímeros de revestimento capazes de reduzir a lixiviação do fármaco, da ração para a água. Dessa forma, o principal desafio foi a escolha de um polímero que não oferecesse risco à saúde dos peixes. Assim,

foram escolhidos aqueles de uso seguro para consumo humano. Ainda, o filme formado com o polímero deveria apresentar baixa solubilidade na água, a fim de reduzir a taxa de lixiviação do fármaco. Assim sendo, foram selecionados polímeros comumente empregados nos processos de revestimento de comprimidos e cápsulas utilizados na terapêutica humana, tendo como principal característica o baixo custo, disponibilidade, solubilidade em uma vasta opção de solventes, estabilidade a luz, calor e umidade e, principalmente, não serem considerados substâncias tóxicas. Foram eles: amido de milho, gelatina, maltodextrina e polivinilpirrolidona (PVP).

Quanto ao nível de ENR a ser incorporado na ração, considerou-se o trabalho de Lucchetti et al. (2004) que preconiza o valor da dosagem de ENR em 10 mg do fármaco por kg de peixe, para tratamento contra bacterioses. Assim, considerando que um peixe adulto consome diariamente 1 % de ração em relação a seu peso corpóreo, a ração medicada a ser preparada deveria conter 1,0 g ENR por kg. Um acréscimo de 20 % no teor de ENR na ração foi efetuado considerando-se possíveis perdas envolvidas no processo de revestimento. Portanto, a ração medicada foi preparada visando conter 1,2 g de ENR por kg.

O solvente utilizado foi água acidificada com 1 % de ácido acético: etanol (70:30 v/v). Esse solvente permitiu a solubilização da ENR na água acidificada, auxiliando o processo de secagem.

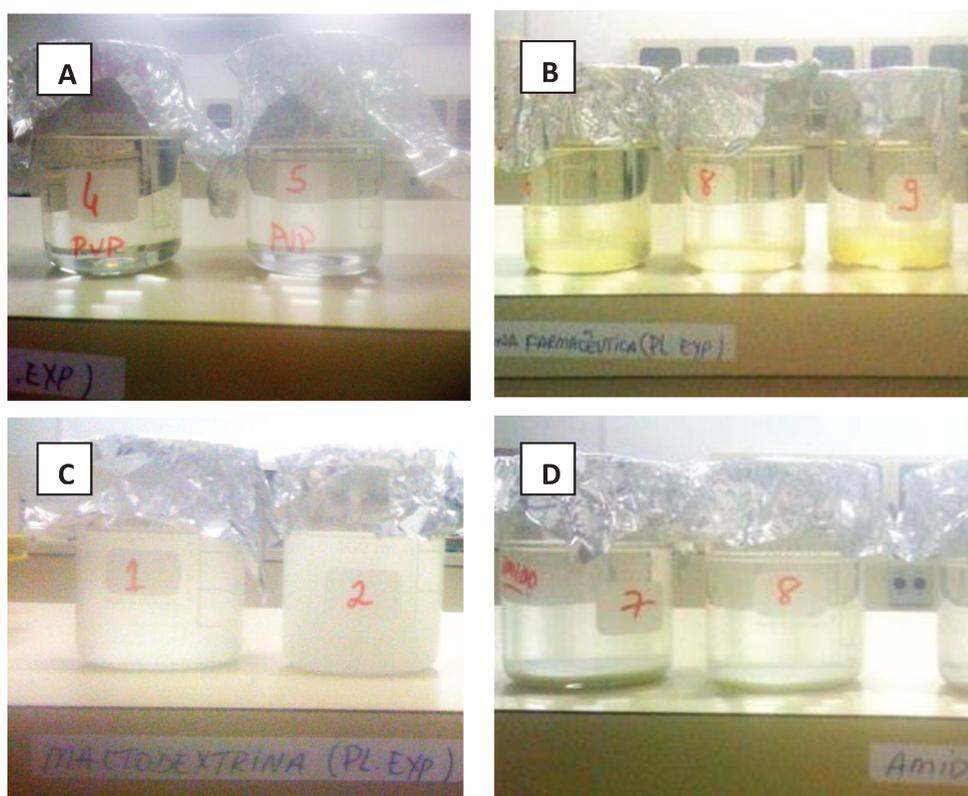
O volume de solvente utilizado para a incorporação do fármaco na ração (com ou sem o polímero de revestimento) foi mantido em 30 mL para todos os ensaios, nos quais foram utilizados 100 g de ração. A presença do álcool etílico foi importante para facilitar a taxa de evaporação da solução durante o processo de revestimento. Esse volume de solvente foi considerado ideal, pois valores inferiores a 30 mL não permitiam uma boa molhabilidade dos grânulos da ração e, conseqüentemente, a homogeneidade da ração medicada ficava comprometida. Por outro lado, um volume elevado de solução levava à desintegração dos grânulos de ração, além de prejudicar o processo de secagem, necessitando do emprego de temperaturas elevadas e/ou maior tempo de secagem.

No processo de secagem foi utilizada temperatura de 50 °C, a fim de evitar uma possível degradação do fármaco, assim como de nutrientes da ração.

#### *Solubilidade dos polímeros na solução de revestimento*

A solubilidade dos polímeros na solução de revestimento foi avaliada individualmente na concentração de 0,5 % do polímero e os resultados obtidos demonstraram a viabilidade apenas do emprego do PVP, devido à precipitação dos demais polímeros no meio hidroalcoólico.

A Figura 3 apresenta o teste de solubilidade das soluções de revestimento, utilizando os diferentes polímeros.



**Figura 3.** Soluções de revestimento com diferentes polímeros. (A) Polivinilpirrolidona (PVP-K30) (totalmente solúvel); (B) gelatina farmacêutica (decantada); (C) maltodextrina (com turbidez) e (D) amido (decantado).

Todos os polímeros testados foram solúveis em solução aquosa, porém na presença de etanol apenas o PVP manteve-se solúvel e apto para os ensaios de revestimento.

#### *Condições operacionais de revestimento*

No processo de revestimento utilizou-se uma betoneira, equipamento considerado simples, de baixo custo e de fácil operação, tornando acessível o processo de obtenção da ração medicada no sistema de produção aquícola.

As condições de operação da betoneira, ou seja, velocidade de rotação, tempo de pulverização e temperatura de secagem dos grânulos, foram otimizadas com o objetivo de obter um material homogêneo, estável e evitar a degradação térmica da ENR. Dessa forma, a rotação do equipamento deve ser suficiente para permitir a molhabilidade de toda a superfície da ração, sem que haja quebra do material. O tempo de pulverização deve permitir a umidificação proporcional dos grânulos, ou seja, favorecer que a ração entre em contato com a solução de revestimento homogeneamente evitando o excesso e, conseqüente, acúmulo de líquidos no equipamento. A temperatura de secagem deve ser branda, concomitante a pulverização, porém suficiente para permitir a evaporação da solução hidroalcoólica sem degradar o fármaco.

Diante do exposto, estabeleceu-se o tempo de 2 min para pulverização, rotação do equipamento de 80 rpm e temperatura máxima de secagem de 50 °C, durante 10 min.

#### *Produção da ração medicada*

Um lote inicial da ração medicada contendo 0,5 % e 2,0 % de PVP foi produzido utilizando-se as condições otimizadas do processo. O material contendo 0,5 % de PVP também foi empregado na etapa de desenvolvimento e validação analítica.

## **Desenvolvimento e validação do método analítico para determinação da enrofloxacin na ração medicada**

A disponibilidade de um método analítico seletivo, linear, exato e preciso foi imprescindível para permitir a avaliação do estudo de lixiviação. Devido às características físico-químicas da ENR, a técnica escolhida foi a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

O método de preparo da amostra foi simples e rápido, envolvendo etapas sucessivas de extração em ultraturrax e ultrassom, seguido por centrifugação, diluição e filtração.

### *Amostragem e preparo da solução amostra*

O procedimento de extração foi otimizado avaliando a eficiência de extração da ração medicada com ENR. O teor de ENR na ração foi determinado por calibração externa. Para tanto, uma curva analítica foi construída nas concentrações  $1,13 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $2,26 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $5,64 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $6,77 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $9,03 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $11,29 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Estudos iniciais para o estabelecimento e otimização das etapas do processo de extração da ENR foram realizadas baseando-se nas condições descritas por Lucchetti et al. (2004). Inicialmente foi realizado o processo de extração sólido – líquido, utilizando 1 g de ração revestida e 10,0 mL de solução extratora (solução aquosa de ácido fórmico 1 % e acetonitrila na proporção 70:30, v/v). A presença da fração orgânica (ACN) concomitante a fração aquosa (água acidificada) proporcionou os melhores resultados de eficiência de extração da ENR quando comparada a extração com um único solvente. O rompimento dos péletes se deu através da utilização do dispersor ultraturrax por 1 min, o que permitiu homogeneizar uniformemente a amostra. A centrifugação a 2800xg durante 5 min foi suficiente para permitir a separação do resíduo e sobrenadante. Para garantir a extração exaustiva da amostra, esse procedimento foi repetido por mais uma vez completando o volume final para 25,0 mL com a solução extratora, do qual foi retirado 1,0 mL e diluído a 10,0 mL.

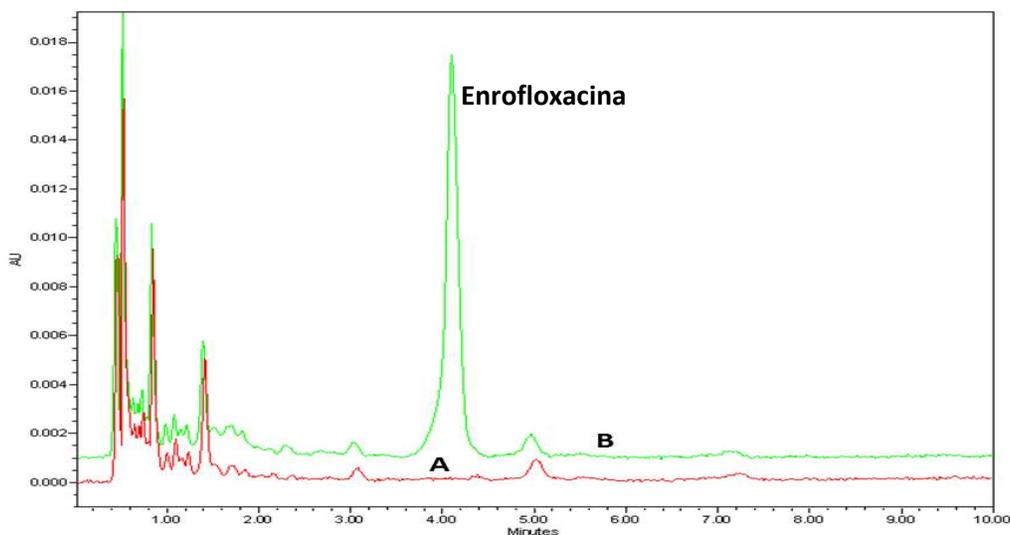
### *Estabelecimento das condições cromatográficas*

Para a quantificação da ENR na ração foram realizados testes prévios variando-se tipos e diâmetros de colunas analíticas, proporção e vazão dos eluentes a fim de se otimizar a resolução do pico de interesse e o tempo de retenção, reduzindo assim o custo com solventes orgânicos e o tempo de corrida em cada análise. Deste modo quantificação da ENR na ração foi realizada numa coluna monolítica RP-18 (Merck), nas dimensões de 100 x 3 mm empregando como fase móvel ácido fórmico 1 % e acetonitrila (92:8 v/v). A vazão empregada foi de 1,5 mL min<sup>-1</sup> utilizando detector de arranjo de diodos (DAD) a 280 nm. Essas condições cromatográficas permitiram a análise da ração em menos de 5 min.

### *Validação do método analítico*

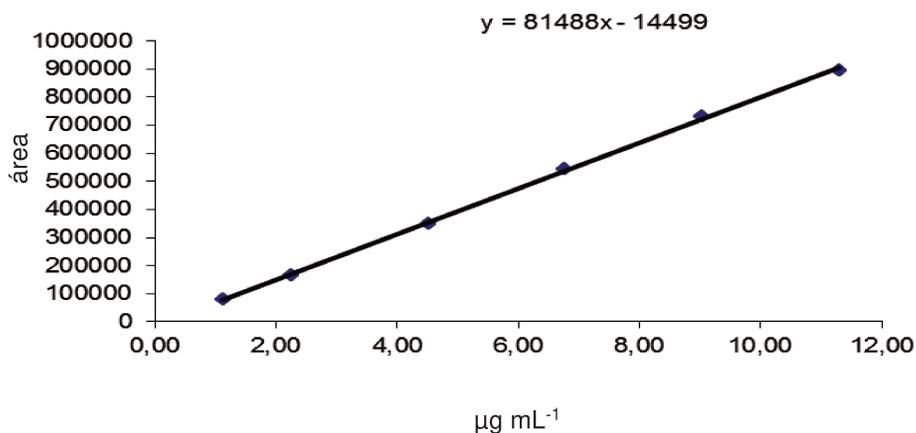
Os parâmetros de validação avaliados foram: seletividade, linearidade, faixa linear precisão intradia, precisão interdia, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

A seletividade do método foi comprovada pela ausência de pico interferente na ração branco (n=10) no tempo de retenção da ENR. A Figura 4 apresenta os cromatogramas do branco e amostra contendo ENR.



**Figura 4.** Cromatogramas obtidos por HPLC a 280 nm da (A) ração branco e (B) ração medicada.

A linearidade foi avaliada através do cálculo do coeficiente de correlação ( $r$ ) da curva analítica construída com 6 pontos de concentração, no intervalo de 1,13 e 11,29  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 5). O valor obtido foi de  $r = 0,9997$ , o qual atende o critério mínimo aceitável recomendado pela ANVISA ( $r = 0,99$ ).



**Figura 5.** Curva analítica da enrofloxacina.

O resultado obtido na determinação da precisão intracorrida (repetibilidade) apresentou coeficiente de variação (CV) de 2,98 % e a precisão intercorridas (intermediária), avaliada em três dias consecutivos, apresentou CV de 2,26 %, os quais atendem o Guia de Validação da ANVISA (2003), que recomenda que em condições de precisão intra e intercorridas o valor de CV não deva exceder 5,0 %.

Devido ao fato de não dispormos de amostra certificada nem de outro método analítico validado para a determinação da ENR na ração medicada, a exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação através da adição da ENR na ração em três níveis de concentração: 600, 1200 e 1800  $\mu\text{g g}^{-1}$ , tendo-se obtido valores de porcentagem de recuperação de 98,8 %, 101,1 % e 102,4 %, respectivamente. Cabe mencionar que o Guia da ANVISA não recomenda valores de porcentagem de recuperação. Todavia, os resultados obtidos estão dentro da faixa de aceitação preconizada pelo Guia de Validação do MAPA (2010), que é de 97 a 103 % para analitos em concentrações de 1000  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

O limite de detecção verificado para a ENR foi de  $4,0 \mu\text{g g}^{-1}$  e o limite de quantificação foi de  $17,3 \mu\text{g g}^{-1}$ , os quais atendem as necessidades do estudo.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados obtidos na validação do método analítico.

**Tabela 2:** Resultados da validação do método analítico desenvolvido

<b>Parâmetros</b>	<b>Enrofloxacina</b>
Linearidade (r) $y = 81488x + 14499$	0,9997
Seletividade (n=10)	seletivo
Exatidão (% recuperação, n=3)	
$600 \mu\text{g g}^{-1}$	98,8
$1200 \mu\text{g g}^{-1}$	101,1
$1800 \mu\text{g g}^{-1}$	102,4
Precisão intracorrída (CV %, n=7)	2,98
Precisão intercorrídas (CV %, n=13)	2,26
LOD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	4,0
LOQ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	17,3

LOD = Limite de Detecção; LOQ = Limite de quantificação.

### **Estudo do processo de lixiviação**

A partir da escolha do PVP como polímero de revestimento, construiu-se um planejamento experimental fatorial  $2^{4-1}$  com o objetivo de avaliar as variáveis consideradas mais importantes no estudo de lixiviação da ENR da ração para a água. As variáveis selecionadas foram: pH (7,0 e 7,8), temperatura da água (22 e 28 °C), tempo de permanência de ração durante o período de tratamento (5 e 30 min) e a concentração do polímero na solução de revestimento (0,5 e 2,0 %, m/v). A resposta avaliada no planejamento experimental foi a porcentagem de lixiviação do fármaco.

Durante o tratamento de um animal doente na piscicultura, o medicamento é administrado para toda a população que compartilha o mesmo ambiente. Nesses casos, durante a terapia o fármaco fica disponível aos animais que apresentam dificuldades de se alimentar da ração por um determinado período de tempo (Klesius, 1995). Portanto, a faixa da variável tempo foi estabelecida considerando-se essa dificuldade do animal doente em se alimentar durante o tempo de tratamento. Já as condições de temperatura utilizadas no ensaio, estão relacionadas com as variações de clima e temperatura das águas do Brasil. O pH estudado foi o valor médio encontrado nos sistemas de produção.

O teor de ENR nas rações medicadas utilizadas nos ensaios do planejamento experimental, revestidas em soluções contendo 0, 0,5 e 2,0 % de PVP foram, inicialmente, quantificadas por HPLC. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Teor de enrofloxacin (ENR) nas rações medicadas utilizadas nos ensaios do planejamento experimental.

Revestimento PVP (%)	Umidade <sup>1</sup> (%, m/m)	Teor médio ENR (%, m/m) <sup>2</sup>	CV <sup>3</sup> (%)
0	12,66	0,097 (n=3)	1,33
0,5	13,30	0,115 (n=8)	4,27
2,0	12,89	0,109 (n=8)	4,42

<sup>1</sup> determinada em triplicata; <sup>2</sup> teor em base seca; <sup>3</sup> CV= coeficiente de variação.

Pelos resultados apresentados na Tabela 3, verifica-se uma baixa dispersão dos resultados (CV menor do que 4,42) relativos ao teor de ENR nas rações constatando-se, assim, uma boa uniformidade no processo de aspersão da ENR durante o preparo da ração medicada. Ou seja, a obtenção de uma ração homogênea quanto ao conteúdo de ENR.

A seguir, realizou-se o teste de lixiviação de acordo com os ensaios propostos no planejamento experimental (Tabela 1). Na Tabela 4 são apresentados os resultados obtidos.

**Tabela 4.** Respostas do planejamento experimental fracionário 2<sup>4-1</sup>.

Ensaio	Variáveis estudadas				Respostas
	Temperatura (°C)	PVP <sup>1</sup> (%)	Tempo (min)	pH	Lixiviação (%)
01	28	2,0	30	7,8	29,97
02	28	2,0	5	7,0	26,71
03	28	0,5	30	7,0	32,52
04	28	0,5	5	7,8	20,16
05	22	2,0	30	7,0	28,42
06	22	2,0	5	7,8	1,78
07	22	0,5	30	7,8	20,58
08	22	0,5	5	7,0	7,95

<sup>1</sup> PVP = polivinilpirrolidona.

As respostas obtidas nos ensaios do planejamento experimental foram processadas utilizando-se o software *Statística*, versão 5.0, para determinar os efeitos das variáveis.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados dos efeitos das variáveis sobre a taxa de lixiviação.

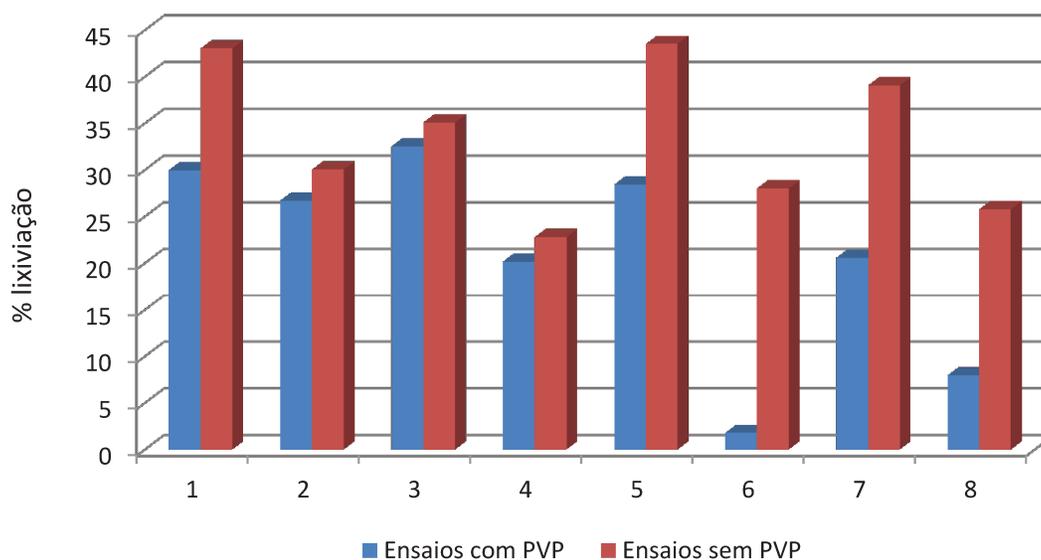
**Tabela 5.** Efeito das variáveis estudadas no planejamento fracionário sobre a taxa de lixiviação da enrofloxacina presente na ração.

Variáveis	Efeitos (% lixiviação)
Temperatura (°C)	12,66*
PVP <sup>1</sup> (%)	1,42
pH	-5,78
Tempo (min)	13,72*

<sup>1</sup> PVP = polivinilpirrolidona; (\*) Significativo estatisticamente (p<0,05).

Conforme os dados da Tabela 5, as variáveis estatisticamente importantes foram a temperatura e o tempo de permanência da ração na água, ambas com efeitos positivos na mesma ordem de grandeza. Isso significa que um aumento da temperatura da água de 22 para 28 °C promove um aumento na taxa de lixiviação de 12,66 %. Para o tempo de permanência na água, um aumento de 5 para 30 min promove um aumento da taxa de lixiviação de 13,72 %.

Visto que, quando utilizado na solução de revestimento na faixa de concentração de 0,5 a 2,0 %, a PVP não teve efeito significativo na taxa de lixiviação da ENR da ração para a água, decidiu-se repetir as condições experimentais do planejamento experimental sem a presença do polímero, com o objetivo de verificar a eficiência do mesmo na redução da taxa de lixiviação. Na Figura 6 são apresentados os resultados obtidos na taxa de lixiviação da ENR, da ração com e sem o revestimento de PVP, utilizando-se solução contendo 0,5% do polímero.



**Figura 6.** Efeito da polivinilpirrolidona (PVP-K30) 0,5% na taxa de lixiviação da enrofloxacina (ENR) contida na ração para a água comparado a ração sem a presença do PVP. As condições dos ensaios estão apresentadas na Tabela 4.

Verifica-se que em todas as condições experimentais (temperatura, tempo e pH) houve redução da taxa de lixiviação da ENR quando do revestimento da ração com PVP. Os melhores resultados na redução da taxa de lixiviação foram nas condições dos ensaios 6 (2,0 % de PVP) e 8 (0,5 % de PVP), os quais foram realizados nas condições de 22 °C e 5 min de permanência da ração na água. Os dados indicam que solução de revestimento contendo 0,5 % de PVP foi suficiente para minimizar a lixiviação da ENR. Entretanto, estudos adicionais são necessários para otimizar o revestimento da ração com PVP.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O método analítico desenvolvido para a determinação de ENR em ração medicada para peixes apresentou-se apropriado para o fim a que se destina, sendo que os dados de validação se encontram dentro da conformidade com os guias de validação da ANVISA (2003) e do MAPA (2010).

Em geral, a ração medicada contendo ENR e obtida pelo processo de revestimento com solução contendo o polímero polivinilpirrolidona (PVP-K30) apresentou várias vantagens, entre elas: uniformidade da dose do antibiótico nas rações medicadas, facilidade no preparo e possibilidade de ajuste da dose de antibiótico durante o período de tratamento dos peixes com a ração medicada, fluvariabilidade da ração e baixo custo de produção.

O revestimento da ração medicada, utilizando-se soluções contendo 0,5 % ou 2,0 % de PVP-K30, reduziu a taxa de lixiviação da ENR. Porém, essa redução depende significativamente da temperatura e do tempo de permanência da ração na água.

O processo de revestimento desenvolvido requer o emprego de equipamentos simples, de fácil obtenção, operação e de baixo custo e constitui um avanço no desenvolvimento de rações medicadas a serem utilizadas na piscicultura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, **RE nº 899, de 29/05/2003**. Brasil, 2003. Disponível em < [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)>. Acesso em agosto de 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet. **RDC nº 253, de 16/09/2003**. Brasil, 2003. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>>. Acesso em agosto de 2012.

ALLEN Jr., L. V. The Art, science and technology of pharmaceutical compounding. 2. ed. Washington, D.C.: **American Pharmaceutical Association**. 493 p. 2002.

AOAC INTERNATIONAL. Official Methods Of Analysis Of The Association Analytical Chemists. 17.th Ed. Gaithersburg, Maryland. Method 934.01. 2000.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Responsible use of antibiotics in aquaculture**, 89 p. 2005. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0282e/a0282e00.pdf>, Acesso em setembro de 2011.

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). **Summary of evaluations performed by the joint** FAO/WHO expert committee on food additives. Enrofloxacin. 1997 <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v39je06.htm>. Acesso dia 10 de julho de 2010.

FAO/OIE/WHO. Report of a Joint FAO/OIE/WHO Expert **Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance**. Issued by the World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture

Organization of the United Nations and the World Organisation for Animal Health. Seoul, Republic of Korea. 2006.

LUCCHETTI, D.; FABRIZI, L.; GUANDALINI, E.; PODESTA, E.; MARVASI, L.; ZAGHINI, A.; CONIL, E. Long depletion time of enrofloxacin in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**., 48 pp. 3912–3917. 2004.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 9, de 30/03/2007**. Ementa: Aprova os Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carne (Bovina, Aves, Suína e Eqüina), Leite, Mel, Ovos e Pescado do exercício de 2007. Publicada no Diário Oficial da União em 04/04/2007, Seção 1, Página 7. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/>>. Acesso em março de 2011.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 8, de 29/04/2010**. Ementa: Aprova os Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carne (Bovina, Aves, Suína e Eqüina), Leite, Mel, Ovos e Pescado do exercício de 2010. Brasil. 2010. Disponível em <[http://members.wto.org/crnattachments/2010/sps/BRA/10\\_2156\\_00\\_x.pdf](http://members.wto.org/crnattachments/2010/sps/BRA/10_2156_00_x.pdf)>. Acesso em 19/08/2012.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº577, de 27/12/2010**. Guia de Validação de Procedimentos Analíticos e Controle de Qualidade - Medicamentos Veterinários, Farmoquímicos, Fármacos e outras Substâncias em Produtos para Alimentação Animal e Matrizes de Origem Biológica. Brasil. 2010. Disponível em [ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsessp/bibliote/informe\\_eletronico/2011/iels.jan.11/lels06/U\\_PT-MAPA-SDA-577\\_271210.pdf](ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsessp/bibliote/informe_eletronico/2011/iels.jan.11/lels06/U_PT-MAPA-SDA-577_271210.pdf)>. Acesso em agosto de 2012.

USP Pharmacist's pharmacopeia. 28. ed. Rockville: **The United States Convention**.. 3187 p. 2005.

SAMUELSEN, O B. Pharmacokinetics of quinolones in fish: a review. ***Aquaculture***. ;255(1–4):55–75. 2006.

SOARES J, M. S. **Características físicas e valor biológico de rações aquáticas elaboradas em extrusor de dupla rosca com diferentes níveis de substituição do farelo de soja pela soja integral**. 2000. 185f. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2000

Thoma, K., Bechtold, K. Enteric coated hard gelatine capsules. **Capsugel Technical Bulletin**, 1992;

## CONCLUSÕES GERAIS

A intensificação da produção aquícola reflete no aparecimento de surtos infecciosos ocasionando grandes perdas econômicas aos produtores. Para combater as principais bacterioses, antimicrobianos são adicionados a ração de forma inadequada, podendo se lixiviar do pélete para a água durante o período de tratamento. Uma possível alternativa para minimizar a lixiviação desses fármacos no ambiente e garantir homogeneidade da dose durante o tratamento dos animais é o revestimento com polímeros, um dos mais antigos processos farmacotécnicos utilizados na indústria farmacêutica.

No presente estudo, foi estabelecido um procedimento de elaboração da ração medicada contendo enrofloxacina (ENR) e revestida com polivinilpirrolidona (PVP-K30). Para tanto, primeiramente foi desenvolvido e validado um método analítico para a determinação da ENR na ração, o qual atendeu o guia de validação da ANVISA (2003) e do MAPA (2010).

A técnica de revestimento por aspersão garantiu a uniformidade da dose de ENR em todos os péletes da ração medicada, além de manter o balanceamento nutricional inicial da ração.

O revestimento da ração medicada tanto com 0,5 % quanto com 2,0 % de PVP reduziu a taxa de lixiviação da ENR da ração para a água. Porém, essa taxa de redução dependeu significativamente da temperatura e do tempo de permanência da ração na água.

Para estudos futuros recomenda-se a realização de ensaios de toxicidade aguda dos polímeros estudados, estudos *in vivo* e de biodisponibilidade do medicamento em presença desses polímeros, assim como testes de lixiviação dessa ração revestida diretamente nos meios de criação, em climas e densidades reais de produção.