



JULIANA ANDRADE TELES

**Estudo farmacocinético da enrofloxacin em tilápia-do-Nilo  
(*Oreochromis niloticus*) utilizando ração medicada preparada  
com recobrimento polimérico**

**CAMPINAS**

**2013**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**JULIANA ANDRADE TELES**

**Estudo farmacocinético da enrofloxacin em tilápia-do-Nilo  
(*Oreochromis niloticus*) utilizando ração medicada preparada  
com recobrimento polimérico**

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

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE  
DEFENDIDA PELA ALUNA JULIANA ANDRADE TELES E ORIENTADA  
PELO PROF. DR. FELIX GUILLERMO REYES REYES

Assinatura do orientador

---

**CAMPINAS**

**2013**

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

Teles, Juliana Andrade, 1979-  
T236e Estudo farmacocinético da enrofloxacin em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando ração medicada preparada com recobrimento polimérico / Juliana Andrade Teles. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Farmacocinética. 2. Antimicrobiano. 3. Peixe. 4. Enrofloxacin. 5. Tilápia-do-Nilo. I. Reyes Reyes, Felix Guillermo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Pharmacokinetic study of enrofloxacin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using medicated feed prepared with polymer coating

**Palavras-chave em inglês:**

Pharmacokinetic

Antimicrobial

Fish

Enrofloxacin

Nile tilapia

**Área de concentração:** Ciência de Alimentos

**Titulação:** Doutora em Ciência de Alimentos

**Banca examinadora:**

Felix Guillermo Reyes Reyes [Orientador]

João Ernesto de Carvalho

Fabiana Pilarski

Claudio Martin Jonsson

Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz

**Data de defesa:** 03-12-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes  
Orientador

---

Dr. João Ernesto de Carvalho  
Membro Titular  
UNICAMP

---

Dra. Fabiana Pilarski  
Membro Titular  
UNESP

---

Dr. Claudio Martin Jonsson  
Membro Titular  
EMBRAPA

---

Dra. Sonia Claudia do Nasmicento de Queiroz  
Membro Titular  
EMBRAPA



---

Prof. Dr. Miguel Arcaño Areas  
Membro Suplente  
UNICAMP

---

Dr. Gustavo Duarte Mendes  
Membro Suplente  
UNICAMP

---

Dra. Débora Renata Cassoli de Souza  
Membro Suplente  
EMBRAPA





## RESUMO GERAL

A enrofloxacin (ENR) é um antimicrobiano de exclusiva aplicação veterinária e possui como metabólito a ciprofloxacina (CIP), exclusiva de uso humano. No Brasil, a ENR não é permitida na aquicultura, porém, há evidências do seu uso nesse sistema de produção de alimentos. Por este motivo, em 2010, o MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem animal (PNCRC/Animal), a incluiu na lista dos antimicrobianos a serem monitorados em peixes de cultivo. Diante da intensificação na produção de tilápias no Brasil, da possível utilização indevida da ENR na piscicultura brasileira, da falta de informações terapêuticas com ENR para esta espécie e dos danos à saúde pública que isto pode gerar através do uso indiscriminado desse antimicrobiano, o presente trabalho teve o objetivo de realizar estudo farmacocinético de dose única ENR (10 mg kg<sup>-1</sup> p.v) através de ração medicada (0.1% de ENR) em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). A ENR (padrão analítico ≥ 98%) foi dissolvida em solução alcoólica acidificada e adicionada a uma solução contendo o polímero, polivinilpirrolidona (PVP), e incorporada à ração comercial. O teor de ENR na ração foi quantificado (1.047 mg g<sup>-1</sup>) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de fluorescência (HPLC-FLD). Os peixes foram medicados através dessa ração e amostras de plasma e músculo foram coletadas nos seguintes tempos: 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120h após a administração. Foram desenvolvidos e validados métodos analíticos em HPLC-FLD para quantificação da ENR e CIP nas matrizes plasma e músculo. Os métodos analíticos apresentaram desempenho satisfatório na matriz plasma com limites de quantificação (LOQ) de 3 ng mL<sup>-1</sup> obtidos para ambos analitos e 10.0 e 7.0 ng g<sup>-1</sup>, no músculo, para CIP e ENR, respectivamente. Em todos os métodos foram utilizadas para quantificação dos analitos, curvas analíticas construídas pela fortificação das matrizes. Quanto aos parâmetros farmacocinéticos obtidos da ENR, para plasma e músculo, a concentração máxima obtida foi de 1.241 ± 0.423 µg mL<sup>-1</sup> e 2.166 ± 0.742 µg g<sup>-1</sup>, respectivamente, no tempo de 8h demonstrando absorção lenta. O alto volume de distribuição (V<sub>d</sub>) no plasma (7.03L kg<sup>-1</sup>), os valores da relação entre concentração músculo/plasma (1.12 a 3.82) indicaram boa distribuição no tecido muscular. Foi possível detectar e quantificar o metabólito (CIP), porém a taxa de conversão foi baixa

(1.3%). Por último, o  $T_{1/2K_e}$  de 2.08 dias no músculo, indica eliminação lenta e longo período de carência para que o produto cárneo possa ser consumido. O uso de antimicrobianos sem dados toxicológicos e farmacológicos para a espécie a qual se destinam tem dentre várias consequências, o aumento do risco à exposição de resíduos com valores acima daqueles permitidos (LMRs) e aumento na incidência/prevalência de resistência bacteriana no animal e no ser humano.

## ABSTRACT

Enrofloxacin (ENR) is an exclusive antimicrobial veterinary application and has as metabolite ciprofloxacin (CIP), exclusive for human use. In Brazil, the ENR is not permitted in aquaculture, however, there is evidence of its use in this system of food production. For this reason, in 2010, MAPA (Ministry of Agriculture, Livestock and Supply) through the National Plan for Control of Residues and Contaminants in animal products (PNCRC/Animal), included in the list of antimicrobials to be monitored in fish cultivation. Given the intensification of tilapia production in Brazil, the possible improper use of ENR in Brazilian farming, the lack of information with therapeutic ENR for this species and harm to public health this could generate through the indiscriminate use of this antimicrobial, the aim of this work was to realize a single-dose pharmacokinetic study with ENR ( $10 \text{ mg k}^{-1} \text{ bw}$ ) through medicated feed (0.1% ENR) in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). ENR (analytical standard  $\geq 98 \%$ ) was dissolved in acidified alcohol solution and added to a solution containing the polymer, polyvinylpyrrolidone (PVP) and incorporated into commercial feed. The content of ENR in feed medicated was quantified ( $1.047 \text{ mg g}^{-1}$ ) using high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD). The fish were medicated and its plasma and muscle samples were collected at the following times: 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 and 120h after administration. Analytical methods were developed and validated for HPLC-FLD for quantification of ENR and CIP in plasma and muscle. Analytical methods showed satisfactory performance in plasma with limits of quantification (LOQ) of  $3 \text{ ng mL}^{-1}$  obtained for both analytes, and in muscle, 7.0 and  $10.0 \text{ ng g}^{-1}$  for CIP and ENR, respectively. In all methods were used for quantification of analytes, standard curves constructed by fortification of matrices. About the pharmacokinetic parameters obtained from the ENR for plasma and muscle, the maximal concentration of ENR was  $1.241 \pm 0.423 \text{ mg mL}^{-1}$  for plasma and  $2.166 \pm 0.742 \text{ mg g}^{-1}$  for muscle, after 8h showing slow absorption. The high volume of distribution ( $V_d$ ) in plasma ( $7.03 \text{ L kg}^{-1}$ ), the values of the ratios between muscle concentration/plasma (1.12 to 3.82) indicated good distribution in muscle tissue. It was possible to detect and quantify the metabolites (CIP), but the conversion rate was low (1.3%). Finally, the  $T_{1/2K_e}$  2.08 days in muscle indicates slow elimination and suggested long period of time for the meat product to

be consumed. The use of antimicrobial agents without pharmacological and toxicological data for the species which it is applied have several consequences, like increasing the risk of exposure of residues above those permitted ( MRLs) and increased incidence/prevalence of bacterial resistance in animals and humans.

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xxi
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxv
INTRODUÇÃO GERAL	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	02
<b>CAPÍTULO I. Considerações sobre a enrofloxacina na piscicultura</b>	<b>03</b>
RESUMO	05
ABSTRACT	06
INTRODUÇÃO	07
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	08
Panorama da aquicultura: tilapicultura brasileira	08
Doenças de origem bacteriana em tilápias cultivadas no Brasil	12
Antimicrobianos na aquicultura	18
Enrofloxacina: aspectos farmacológicos em peixes	24
Os riscos à saúde pública e ao meio ambiente no uso da enrofloxacina	32
Aspectos regulatórios e de inspeção envolvendo antimicrobianos	34
Relação PK/PD: um caminho para o uso racional de antimicrobianos na aquicultura	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
<b>CAPÍTULO II. Ração medicada com enrofloxacina preparada através de revestimento polimérico para uso na piscicultura</b>	<b>51</b>
RESUMO	53
ABSTRACT	54
INTRODUÇÃO	55
MATERIAL E MÉTODOS	57

Reagentes e Materiais	57
Equipamentos	57
Padrão e soluções	58
Padrão	58
Solução estoque	58
Solução de extração	58
Solução para revestimento	58
Amostras	58
Ração medicada	60
Preparo da ração medicada	60
Método analítico	60
Procedimento de preparo de amostra	60
Extração	60
Separação, detecção e quantificação	60
Validação do método analítico	62
Linearidade	62
Seletividade e efeito matriz	62
Exatidão, precisão e limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)	63
RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
Processo de revestimento da ração	64
Preparo de amostra	65
Validação do método analítico	66
Análise da ração medicada	69
CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
<b>CAPÍTULO III. Estudo farmacocinético da enrofloxacina em tilápia-do-Nilo</b>	73
<b>(<i>Oreochromis niloticus</i>) após administração oral em dose única</b>	
RESUMO	75
ABSTRACT	76
INTRODUÇÃO	77
MATERIAL E MÉTODOS	79
Reagentes e materiais	79
Equipamentos	79
Padrões e soluções	80
Padrões	80
Soluções estoque	81

Soluções de trabalho ( <i>pool</i> )	81
Solução do padrão interno	81
Amostras	81
Método analítico	81
Plasma: Extração e limpeza	82
Plasma: Separação, detecção e quantificação	82
Músculo: Extração e limpeza	83
Músculo: Separação, detecção e quantificação	85
Validação dos métodos analíticos	85
Linearidade	85
Seletividade e efeito matriz	86
Exatidão, precisão e limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)	86
Estudo de estabilidade	87
Analitos em solução	87
Analitos no plasma	87
Ensaio farmacocinético	88
Análise farmacocinética	90
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	90
Preparo de amostra	90
Plasma	91
Músculo	91
Validação dos métodos analíticos	91
Plasma	91
Músculo	96
Estudos de estabilidade	100
Analitos em solução	100
Analitos no plasma	101
Análise das amostras de plasma e músculo de tilápias	103
Análise farmacocinética	104
<b>CONCLUSÕES</b>	110
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	110
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	115
ANEXO. Aprovação do comitê de ética / UNESP – Jaboticabal	117





**Dedico este trabalho a minha filha, Catarina.**



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida!

Ao Henrique, meu marido, por todo seu amor dedicado a mim e a nossa filha.

Aos meus pais a quem devo a pessoa que sou.

As minhas avós Maria Ignez e Norma que me ensinaram o valor do conhecimento.

Ao Dr. Edilson de Castro que me ajudou a trazer ao mundo a coisa mais rica que tenho e mostrou que na vida nada é por acaso e que às vezes é preciso “desacelerar”.

Às amigadas que fiz durante este período, pessoas com as quais em diferentes momentos aprendi, recebi apoio e que muito me incentivaram para que eu finalizasse este trabalho: Renata Cabrera, Juliana Hashimoto, Marcela Sismotto e Silvia Helena Vitorino.

À Michelle Del Bianchi e Luciana Castello Branco que se dispuseram a me ajudar de coração aberto e a tornar isto real.

Ao pessoal do CAUNESP/UNESP - Jaboticabal: Silvia, Thais, Santiago, Nycolas, Gustavo, Pedro e em especial à Dra. Fabiana Pilarski por assumir junto comigo a ideia do projeto oferecendo todo apoio e atenção.

As minhas queridas amigas, minhas quase irmãs: Emmanuelle Pilarski, Karen Martins, Fernanda Romanini e Adriana Porfírio.

Ao Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes que depositou extrema confiança em mim, dando liberdade para que eu escolhesse os rumos deste trabalho.

Aos membros da banca pelas orientações e correções concedidas

À CAPES e à Faculdade de Engenharia de Alimentos pelo apoio financeiro e institucional.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### **CAPÍTULO I. Considerações sobre a enrofloxacin na piscicultura**

- Figura 1. Bactérias patogênicas que acometem as diferentes fases do cultivo de tilápia no Brasil 15
- Figura 2. Estrutura molecular da enrofloxacin e seu metabólito, ciprofloxacina 24
- Figura 3. Relações PK/PD empregados na avaliação da eficácia de antimicrobianos 39

### **CAPÍTULO II. Ração medicada com enrofloxacin preparada através de revestimento polimérico para uso na piscicultura**

- Figura 1. Fluxograma do método analítico desenvolvido para determinação de ENR na ração 61
- Figura 2. Curvas analíticas no solvente e no extrato fortificado para a ENR na ração e a ausência de efeito matriz 66
- Figura 3. Amostra branca e matriz fortificada com ENR ( $10 \mu\text{g g}^{-1}$ ) na ração 67
- Figura 4. Curva analítica para a determinação de ENR na ração e gráfico de resíduos da regressão 67

### **CAPÍTULO III. Estudo farmacocinético da enrofloxacin em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) após administração oral em dose única**

- Figura 1. Estrutura molecular das fluoroquinolonas 80
- Figura 2. Fluxograma do método analítico desenvolvido para determinação de CIP e ENR no plasma 83
- Figura 3. Fluxograma do método analítico desenvolvido para determinação de CIP e ENR no músculo 84
- Figura 4. Curvas analíticas dos analitos CIP (a) e ENR (b) no solvente e no extrato na faixa de 5 a  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  para avaliação de efeito matriz no plasma de tilápia 92
- Figura 5. Curvas analíticas para a determinação de CIP e ENR no plasma de tilápia e gráficos de resíduos da regressão 93
- Figura 6. Cromatogramas (HPLC-FLD) de amostra branco de plasma (a); fortificado em  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  (CIP e ENR);  $30 \text{ ng mL}^{-1}$ (SAR) (b) e (c)  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  (CIP e ENR);  $30 \text{ ng mL}^{-1}$ (SAR) 95

Figura 7.	Curvas analíticas dos analitos CIP (a) e ENR (b) no solvente e no extrato na faixa de 10 a 150 ng g <sup>-1</sup> para avaliação de efeito matriz no músculo de tilápia	96
Figura 8.	Curvas analíticas para a determinação de CIP (a) e ENR (b) no músculo de tilápia e gráficos de resíduos da regressão	97
Figura 9.	Cromatogramas (HPLC-FLD) de amostra branco de músculo (a); fortificado em 10 ng g <sup>-1</sup> (CIP e ENR); 50 ng g <sup>-1</sup> (SAR) (b) e em (c) 150 ng g <sup>-1</sup> (CIP e ENR); 50 ng g <sup>-1</sup> (SAR)	99
Figura 10.	Estabilidade da CIP, ENR, e SAR em solução estoque de 1 mg mL <sup>-1</sup>	100
Figura 11.	Estabilidade da CIP e ENR em amostras de plasma fortificadas (30 ng mL <sup>-1</sup> )	101
Figura 12.	Estabilidade da CIP e ENR em amostras de plasma fortificadas (100 ng mL <sup>-1</sup> )	102
Figura 13.	Estabilidade da CIP e ENR em amostras de plasma fortificadas (1000 ng mL <sup>-1</sup> )	102
Figura 14.	Curva semi-logarítmica da concentração no plasma <i>versus</i> tempo em tilápia-do-Nilo após única administração oral de enrofloxacina na dosagem de 10 mg kg <sup>-1</sup> (p.v) (média ± DP, n = 8)	107
Figura 15.	Curva semi-logarítmica da concentração no músculo <i>versus</i> tempo em tilápia-do-Nilo após única administração oral de enrofloxacina na dosagem de 10 mg kg <sup>-1</sup> (p.v) (média ± DP, n = 8)	107

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I Considerações sobre a enrofloxacin na piscicultura**

Tabela 1.	Produção total, continental e marinha da aquicultura no Brasil entre 2008 e 2010	09
Tabela 2.	Cinco espécies mais produzidas na piscicultura continental brasileira	10
Tabela 3.	Balança comercial do pescado 2011 a jan/jun de 2013	11
Tabela 4.	Principais bactérias patogênicas na tilapicultura brasileira	17
Tabela 5.	Produtos aprovados para uso em peixes	21
Tabela 6.	Agentes antimicrobianos e suas aplicações na aquicultura mundial	22
Tabela 7.	Propriedades físico-químicas da enrofloxacin	25
Tabela 8.	Algumas propriedades farmacocinéticas da enrofloxacin em peixes após administração em dose única	30
Tabela 9.	Algumas propriedades farmacocinéticas de agentes antimicrobianos em tilápias (22 - 30°C)	31
Tabela 10.	Algumas propriedades farmacocinéticas da enrofloxacin em salmão do Atlântico ( <i>Salmo salar</i> ) a 10-12°C	31
Tabela 11.	Subprograma de monitoramento de resíduos e contaminantes para quinolonas em peixe de cultivo (PNCRC/2013)	37

### **CAPÍTULO II. Ração medicada com enrofloxacin preparada através de revestimento polimérico para uso na piscicultura**

Tabela 1.	Composição da ração comercial Pirá 28 <sup>®</sup>	59
Tabela 2.	Valores dos parâmetros de validação do método por LC-FLD para determinação de enrofloxacin (ENR) no ração medicada	69

### **CAPÍTULO III. Estudo farmacocinético da enrofloxacin em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) após administração oral em dose única**

Tabela 1.	Valores médios ( $\pm$ DP) obtidos na biometria realizada nos peixes após o abate (n=8)	89
Tabela 2.	Valores dos parâmetros de validação do método por LC-FLD para determinação de ciprofloxacina (CIP) e enrofloxacin (ENR) no plasma de tilápia	94
Tabela 3.	Valores dos parâmetros de validação do método por LC-FLD para determinação de ciprofloxacina (CIP) e enrofloxacin (ENR) no músculo de tilápia	98

Tabela 4.	Concentração (média $\pm$ DP) de Ciprofloxacina (CIP) e Enrofloxacina (ENR) em plasma e músculo após única administração oral ( $10\text{mg kg}^{-1}$ ) em tilápia (n=8)	103
Tabela 5	Relação da concentração de enrofloxacina e ciprofloxacina no músculo e plasma após única administração oral de $10\text{mg kg}^{-1}$ de ENR (n = 8)	104
Tabela 6.	Parâmetros farmacocinéticos no plasma determinados após única administração oral de enrofloxacina ( $10\text{mg kg}^{-1}$ p. v) em tilápias (n=8)	106
Tabela 7.	Parâmetros farmacocinéticos no músculo determinados após única administração oral de enrofloxacina ( $10\text{mg kg}^{-1}$ p. v) em tilápias (n=8)	106



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AUC – *Area under the curve* ou ASC – Área sob a curva

C<sub>18</sub> – Octadecil

CAUNESP – Centro de Aquicultura da UNESP

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIP – Ciprofloxacina

Cl – *clearance* – depuração

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

C<sub>max</sub> - Concentração máxima

CV - Coeficiente de Variação

DP – Desvio Padrão

EC - Comunidade Europeia (European Commission)

EMA – *European Medicines Agency*

ENR – Enrofloxacin

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA - *Food and Drug Administration*

FLD - Detecção por fluorescência

IDA – Ingestão Diária Aceitável

K<sub>e</sub> – Constante de eliminação

LAPOA- Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos

LC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

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

MMQO – Método dos Mínimos Quadrados Ordinários

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura

ND – Não determinado

OIE - *World Organisation for Animal Health*

ONU – Organização das Nações Unidas

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAMVet - Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal

PD – Parâmetros Farmacodinâmicos

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PTFE - Politetrafluoretileno

Pv – peso vivo

PVDF - Difluoreto de polivinilideno

PVP - Polivinilpirrolidona

PK – Parâmetros Farmacocinéticos

SAR – Sarafloxacina

$T_{1/2}$  – Tempo de meia-vida

$T_{max}$  – Tempo máximo

$V_d$  – Volume de distribuição

UA – Unidade arbitrária

UI – Unidade Internacional

UNESP – Universidade Estadual de São Paulo

VICH - *International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products*

## INTRODUÇÃO GERAL

Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA (BRASIL, 2012), em 2010, como em outros anos anteriores, a tilápia (155.450,8t.) seguida da carpa (94.579t.) foram as espécies mais cultivadas na aquicultura continental. Somadas representaram 63,4% da produção nacional de pescado nesta modalidade.

O crescimento na produção de peixes no Brasil trouxe consigo problemas sanitários relacionados à própria intensificação da atividade. O manejo zootécnico inadequado e o desequilíbrio ambiental atuam como fatores estressantes, induzindo nos peixes, aumento da concentração plasmática de cortisol e depressão dos mecanismos de defesa orgânica, tornando-os susceptíveis às doenças infecciosas e parasitárias. (PILARSKI & SAKABE, 2009).

Atualmente, o Brasil possui três medicamentos veterinários licenciados para uso na aquicultura: dois antibióticos (florfenicol e oxitetraciclina) e um parasiticida (triclorfon) (BRASIL, 2013). A ausência de boas práticas de manejo, aliado à falta de alternativas na terapêutica tem conduzido produtores a utilizarem, em peixes, medicamentos legislados para outras espécies animais sem conhecimento prévio de eficácia clínica, esquemas posológicos e períodos de carência adequados para cada espécie, colocando em risco toda a cadeia produtiva, a saúde pública e o meio ambiente.

Dados farmacocinéticos (PK) e farmacodinâmicos (PD) são exigidos pelas autoridades regulamentadoras para o registro de medicamentos veterinários. A combinação das características de PK e PD na terapia com antimicrobianos prevê a eficácia *in vivo*, contribui para redução da toxicidade ou efeitos adversos no animal e consequentemente reduz o risco de resistência e o nível de resíduo do antimicrobiano no produto destinado ao consumo (GUARDABASSI et al., 2008; BUFFÉ et al,2001).

Na aquicultura de forma geral, há falta de informações científicas acerca desse assunto. Isso dificulta a criação de diretrizes específicas para o uso racional de antimicrobianos e a regulamentação ou não de agentes terapêuticos. Portanto, para a melhoria no uso de antimicrobianos na aquicultura é necessário progredir na coleta de dados de PK/PD nas diversas espécies cultivadas e nos diferentes ambientes em que estão inseridas.

O estudo farmacocinético da ENR na piscicultura nacional, em específico com a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) tem o objetivo de proporcionar a redução de prejuízos relacionados à falta de qualidade do produto final e ao mesmo tempo, reduzir o uso indiscriminado de antibióticos na cadeia produtiva. Conhecer e controlar as características microbiológicas e de resíduos de medicamentos veterinários em peixes são pré-requisitos para conformidade e certificação dos produtos derivados de pescado visando à sua comercialização e também exportação.

Embora o peixe ainda esteja longe de ser a commodity mais lucrativa para o Brasil, o desenvolvimento da aquicultura brasileira depende de uma infraestrutura científica mais bem desenvolvida, de políticas de sustentabilidade, de implantação de boas práticas de manejo, bem como a fiscalização da sanidade aquícola.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lista de Produtos com Licença Vigente.** Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Registros\\_Autorizacao/listas%20de%20produtos/RELVIG\\_042013.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Registros_Autorizacao/listas%20de%20produtos/RELVIG_042013.pdf)> Acesso em: 02 mai. 2013.

BRASIL, 2012. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura – Brasil 2010.** Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/topicos/300-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2010>> Acesso em: 20 set. 2012.

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.

GUARDABASSI, L; JENSEN, L. B; KRUSE, H. **Guia de antimicrobiano em veterinária.** Porto Alegre, 2008. 266p.

PILARSKI, F.; SAKABE, R. Principais Enfermidades Diagnosticadas no Estado de São Paulo: Profilaxia ou Tratamento? 2009.

## CAPÍTULO I

### **Considerações sobre a enrofloxacina na aquicultura**

*Este capítulo será submetido para publicação na Scientia Agricola*



## Considerações sobre a enrofloxacina na piscicultura

### RESUMO

O Brasil possui grandes potencialidades para se tornar um dos maiores produtores e exportadores de peixes no mundo, particularmente de tilápias. Porém, enfrenta o desafio de desenvolver de forma sustentável e com produtos de qualidade exigida pelos mercados. A intensificação na produção de tilápias trouxe consigo problemas sanitários, tornando esses peixes suscetíveis à doenças infecciosas. A falta de regulamentação de medicamentos veterinários na aquicultura abriu portas para seu uso desenfreado de antimicrobianos. A enrofloxacina (ENR) é um antibiótico muito utilizado na medicina veterinária devida suas características farmacológicas. Seu uso na aquicultura brasileira não é permitido, assim como na maioria dos países, exceto China e Tailândia. No entanto, o MAPA através do PNCRC/Animal, em 2010, a incluiu na lista de antimicrobianos a serem monitorados em pescado. Essa inclusão demonstra a suspeita do seu uso no país e/ou a preocupação na violação dos resíduos em pescados importados de países asiáticos. Diante do exposto, a presente revisão visa abordar aspectos de produção de tilápia e sanidade aquícola, fornecer dados farmacológicos da ENR e seus resíduos, bem como apresenta um caminho para a racionalização no uso de antimicrobianos na aquicultura através de índices PK/PD.

Palavras-chave: aquicultura; peixe; medicamento veterinário; resíduos; farmacocinética/farmacodinâmica.

## Considerations of enrofloxacin in aquaculture

### ABSTRACT

Brazil has great potential to become one of the largest fish producers and exporters in the world, particularly tilapia. But facing the challenge of developing a sustainable and quality products demanded by markets. The increase in tilapia production brought with health problems , making these fish susceptible to infectious diseases. The lack of regulation of veterinary drugs in aquaculture has opened its doors to indiscriminate use of antibiotics . Enrofloxacin (ENR) is an antibiotic widely used in veterinary medicine. Its use in Brazilian aquaculture is not allowed, as most countries except China and Thailand. However, the MAPA through PNCRC/Animal, in 2010, included in the list of antimicrobials to be monitored in fish. This inclusion demonstrates the suspicion of its use in the country or concern in violation of residues in fish imported from Asian countries. The aim of the present review is to address aspects of production of tilapia aquaculture and sanitation, provide pharmacological data of ENR and their residues, and presents a way for the rational use of antimicrobials in aquaculture through PK/PD indices.

Keywords: aquaculture; fish; veterinary drug; residues; pharmacokinetic/pharmacodynamic.



## INTRODUÇÃO

O setor da aquicultura tem oferecido oportunidades para o aumento da oferta de alimentos para bilhões de pessoas, contribuindo para a diminuição da pobreza e gerando crescimento na economia. Dentro desse contexto, o Brasil possui grandes potencialidades no crescimento nesse setor, em especial, na produção de tilápias. Contudo, enfrenta o desafio de desenvolvê-la de forma sustentável e com qualidade exigida pelos mercados.

A tilápia sempre foi reconhecidamente uma espécie robusta. Porém, com a intensificação da produção e descumprimento das boas práticas de manejo, problemas sanitários começaram a revelar uma nova situação para esse peixe. Patógenos que nunca haviam sido associados à espécie começaram a ficar cada vez mais presentes no aparecimento de doenças.

A grande escassez de informações, de publicações sobre o uso de antimicrobianos na aquicultura e a falta de regulamentação, principalmente nos países em desenvolvimento, abriram portas para o uso indiscriminado de antimicrobianos. Como consequência do uso desenfreado, elevou-se o risco associado à exposição a altos níveis de resíduos pelo consumidor ao produto cárneo e o pior, propiciou-se o surgimento de cepas bacterianas resistentes.

A enrofloxacin (ENR) foi desenvolvida para exclusivo uso veterinário. É utilizada para diversas infecções associadas ao trato respiratório, entérico, urinário de diversas espécies animais. Possui muitas vantagens na terapia como tempos de meia-vida relativamente longos o que assegura prolongamento do intervalo entre as doses, permitindo administração em dose única. Amplo espectro de ação e boa distribuição nos tecidos. No entanto, em 2005, seu uso em frangos acabou sendo proibido nos Estados Unidos por causa das evidências encontradas à resistência de *Campylobacter* e *Salmonella*. Diante das observações feitas, outros países como Canadá e Austrália também a proibiram e acredita-se que mais países deverão a incluir na lista de fármacos não autorizados. No Brasil ela é permitida para uso em ovinos, caprinos, bovinos, suínos e aves de corte, não sendo permitida na aquicultura. O país ainda não tem restrições ao seu uso.

Na aquicultura brasileira há poucos antibióticos regulamentados (florfenicol e oxitetraciclina), e muitos produtores fazendo uso de medicamentos legislados para outras

espécies animais em peixes. Assim, também é feito com a ENR, pelas suas características farmacológicas, pela sua disponibilidade no mercado e por ser economicamente mais viável. Diante dessa situação, a cada ano o MAPA através do PNCRC/Animal vem atualizando a lista de antimicrobianos a serem monitorados em pescado e a inclusão da ENR na lista em 2010, demonstra a suspeita do seu uso no país e/ou a preocupação na violação dos resíduos em pescados importados de países asiáticos (China e Tailândia) que autorizam o seu uso.

Diante do exposto, a presente revisão tem o objetivo de trazer números atualizados na produção de tilápia e a situação do Brasil dentro deste contexto, aspectos de sanidade aquícola, dados clínicos e farmacocinéticos da enrofloxacina e seus resíduos e por fim, apresenta um caminho para a racionalização no uso de antimicrobianos na aquicultura através da criação de índices PK/PD.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### *Panorama da aquicultura: tilapicultura brasileira*

O consumo mundial de peixes, crustáceos e moluscos alcançou 128 milhões de toneladas em 2010. Do total de peixes, mais de 50% foram provenientes da aquicultura.

Nas últimas cinco décadas, o fornecimento de produtos da pesca e aquicultura ultrapassou o crescimento da população e hoje, abastece mais de 4,3 bilhões de pessoas, contribuindo com 15% de toda proteína animal consumida no planeta. Com o crescimento limitado da pesca extrativa devido à diminuição dos recursos naturais e o aumento populacional, a aquicultura se expande (LARSEN & MATTHEW, 2012). Assim, estimulada pela alta demanda, a projeção é que esse valor chegue a 172 milhões de toneladas em 2021 com o maior crescimento vindo da aquicultura.

Especificamente para o Brasil que possui grande potencial hídrico, extensa faixa litorânea, clima favorável, boa oferta de mão de obra e disponibilidade de grão como milho e soja para produção de ração (OSTRENSKY et al., 2008), a FAO (2012) prevê que o país poderá se tornar um dos maiores produtores do mundo até 2030, ano este em que a produção pesqueira nacional terá condições de atingir 20 milhões de toneladas de pescados provenientes da carnicicultura e piscicultura, principalmente (FAO, 2009; ONU, 2011).

A FAO através do SOFIA (*The State of World Fisheries and Aquaculture*), em sua última publicação, 2012, com dados de 2010, o Brasil apareceu no posto de segundo maior produtor na aquicultura (479.399 t) da América do Sul, seguido do Chile (701.062 t) e no cômputo geral, o 14º do mundo. A produção da aquicultura marinha e continental brasileira representou 37,9% da produção total (1.264.764,9 t) de pescado no país. Uma produção mundial ainda baixa, porém vem crescendo com uma taxa média de 10% ao ano, contra o crescimento mundial de 6% ao ano, no mesmo período. No entanto, com dados atualizados de 2011 (FAO, 2013), o Brasil já subiu duas colocações mundiais (12º do mundo), com números atualizados de 629.309 t superando as expectativas, tendo um incremento de 23,8% em relação ao ano anterior (2010).

Dos peixes produzidos pela aquicultura brasileira, espécies de água doce representaram em 2010, 82,3% da produção nacional (Tabela 1.).

Tabela 1. Produção total, continental e marinha da aquicultura no Brasil ente 2008 e 2010.

Produção	2008		2009		2010	
	t	%	t	%	t	%
Continental	282.008,1	77,2	337.352,2	81,2	394.340,0	82,3
Marinha	83.358,3	22,8	78.296,4	18,8	85.058,6	17,7
Total	365.366,4	-	415.649,4	-	479.398,6	-

Fonte: Brasil, 2012a

A tilápia é a principal espécie cultivada no Brasil (Tabela 2.). Sua produção representou 39,42% do total produzido na piscicultura em 2010 (BRASIL, 2012a). No entanto, segundo Kubitzka et al. (2012), as estatísticas fornecidas pelo MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura apresentam distorções quantitativas, o que significa dizer que muito provavelmente a quantidade realmente produzida seja bem maior do que as estimativas oficiais divulgadas pelo ministério.

Os principais centros produtores de tilápia no Brasil estão situados na região nordeste (Paulo Afonso – BA e reservatórios no Ceará); noroeste paulista (região de Santa Fé do Sul – SP e reservatórios do Rio Paraná, Rio Grande e baixo Rio Tietê) e oeste paranaense. Ainda há áreas em desenvolvimento; como os reservatórios de Furnas, Três Marias (MG) e Serra da Mesa (GO) (ANUALPEC, 2011).

Tabela 2. Cinco espécies mais produzidas na piscicultura continental brasileira.

Espécie	Produção (t)		
	2008	2009	2010
Tilápia	111.145,3	132.958,3	155.450,8
Carpa	67.624,2	80.895,5	94.579,0
Tambaqui	38.833,0	46.454,1	54.313,1
Tambacu	15.459,0	18.492,8	21.621,4
Pacu	15.190,0	18.171,0	21.245,1

Fonte: Brasil, 2012a

Com a popularização da tilápia nos Estados Unidos e Comunidade Européia, a produção mundial da tilápia só tem aumentado (FITZSIMMONS, 2010). Todo esse sucesso pode ser atribuído pela qualidade de sua carne - filé de textura firme e sabor neutro - e por ser um peixe de fácil reprodução e manutenção em cativeiro - menos susceptível às doenças e mais tolerante ao estresse do meio do que outras espécies de peixes (LUCAS & SOUTHGATE, 2012).

A introdução da espécie no Brasil ocorreu em 1971 com exemplares vindos da Costa do Marfim através do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) (OLIVEIRA et al, 2007). Porém, a atividade só veio realmente crescer a partir de 2000, com a implantação de tanques-redes, sobretudo nas águas da União (reservatórios de hidrelétricas) (ANUALPEC, 2011). Diferentemente, a China, teve a espécie introduzida em 1978 (FAO, 2005), anos depois do Brasil e atualmente domina o mercado de tilápia com uma produção próxima a um milhão de toneladas, o equivalente a 40% de toda tilápia produzida no mundo (FAO, 2013) sendo a maior parte destinada ao mercado interno chinês e o restante (220.000 t), exportado como produto processado para mercados dos Estados Unidos, México, Rússia e Comunidade Européia (HANSON et al., 2011)

Histórico de preços elevados e falta de hábito no consumo do pescado no Brasil fizeram a indústria da pesca caminhar a passos lentos. Com o aumento da renda da população brasileira, o consumo nacional per capita anual aumentou. De 6,66 kg em 2005, passou para 9,75kg em 2010. Valor ainda abaixo dos 12kg/habitante/ano recomendados pela OMS – Organização Mundial da Saúde e FAO. Todo esse avanço foi impulsionado não somente pelo aumento da renda e pela busca do alimento saudável, mas pelos baixos preços da venda de peixes de países asiáticos (China e Vietnã) (BRASIL, 2012b). Isso

apoiou o aumento do consumo de peixes no país. Como resultado, a alta demanda e a baixa disponibilidade no mercado brasileiro vem gerando uma balança comercial deficitária no setor nos últimos seis anos (BRASIL, 2012b; SIDONIO et al., 2012)

Recentemente o MDIC (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior) divulgou informações da balança comercial que mostram o elevado déficit em valor e volume de pescado no período de 2011 ao primeiro semestre de 2013 (BRASIL, 2013a). O que se vê é que já na metade do ano de 2013, ultrapassamos todas as importações de 2012 (Tabela 3.).

Os maiores volumes de pescado importados continuam sendo provenientes da China (50.150t), seguido do Chile (39.027t) e Vietnã (26.413t) (BRASIL, 2013a). Juntos representam 51% de todas as importações que incluem filés de merluza, salmão e pangasius.

Tabela 3. Balança comercial do pescado 2011 a jan/jun de 2013.

	2011		2012		2013	
	valor	qtd	valor	qtd	valor	qtd
	(US\$ mil)	(t)	(US\$ mil)	(t)	(US\$ mil)	(t)
Exportação	88.389	17.749	96.740	22.115	90.644	17.676
Importação	633.252	175.555	653.029	192.420	712.001	223.539

Fonte: MDIC/AliceWeb, jul. 2013 (BRASIL, 2013a).

Com relação às exportações, produtos como o camarão (44%), vem acumulando consecutivas quedas nos números totais desde a crise em 2004; a lagosta (23%), sendo quase absolutamente toda destinada aos Estados Unidos e peixes congelados (12%), tendo principais mercados compradores os Estados Unidos, Espanha, França, Japão e Portugal, em ordem de representatividade (SIDONIO et al., 2012; OLIVEIRA, 2009).

Com relação à tilápia, muitos dos empreendimentos voltados para a sua produção no Brasil foram implantados entre 2004 e 2005 com olho na exportação, em particular para os Estados Unidos, visto que as importações de filés de tilápia pelo mercado norte-americano só vinham crescendo. Porém, com grande parte dos frigoríficos brasileiros trabalhando muito abaixo da capacidade máxima para qual foram projetados e taxa cambial

desfavorável, esse mercado se tornou muito difícil de ser competitivo com outros de países tradicionalmente exportadores de filés frescos de tilápia para os Estados Unidos como Equador, Honduras e Costa Rica (KUBITZA, 2007).

Por outro lado, se o mercado interno de tilápias se desenvolver completamente através da oferta de produtos de alta qualidade, seguros e com preços competitivos em relação aos produtos similares no mercado e aos de outras carnes, com preços mais baixos, o consumo se intensificará e conseqüentemente a escala de produção aumentará. A partir daí, o mercado de exportações poderá se tornar uma realidade mesmo sujeita às mudanças nas políticas cambiais (ANUALPEC, 2007; KUBITZA, 2007).

Para então incentivar a competitividade no setor, o governo brasileiro (BRASIL, 2012b) tem mantido barreiras comerciais nas importações de tilápia. No entanto, isso não parece ser suficiente já que há uma enorme dificuldade de licenciamento ambiental para o cultivo em águas públicas e elevadas taxas tributárias (KUBITZA et al., 2007). Somado a isso, o Brasil ainda não conta com uma legislação específica para o setor e programa de inspeção e controle sanitário aquícola eficiente.

#### *Doenças de origem bacteriana em tilápias cultivadas no Brasil*

Tilápias são reconhecidamente robustas, de boa tolerância no manuseio e mais resistentes às infecções bacterianas do que outros peixes, desde que mantidas em águas de boa qualidade e sem variações bruscas de temperatura (PLUMB & HANSON, 2011; KUBITZA, 2008). Porém, com a rápida expansão da tilapicultura no Brasil, problemas sanitários relacionados à própria intensificação da atividade começaram a aparecer e a revelar outra face desse peixe (KUBITZA, 2005; KUBITZA, 2008).

Os sistemas intensivos de criação em tanques-rede, *raceway* e sistema de recirculação são marcados pela alta densidade de estocagem. Isso aumenta o contato físico entre os peixes e a transmissão desses agentes. E ainda, expõe o peixe à situação de estresse que por sua vez, induz ao aumento da concentração plasmática de cortisol e deprime mecanismos de defesa orgânica, aumentando a susceptibilidade às doenças infecciosas e parasitárias (PILARSKI & SAKABE, 2009; URBINATI & CARNEIRO, 2004). Especificamente, em sistemas de recirculação onde há uma mistura das águas de diferentes tanques de produção faz com que haja distribuição de patógenos por todo sistema, levando

a ocorrência de surtos de doenças e conseqüentemente grandes perdas econômicas (KUBITZA, 2000).

Dentre outros erros de manejo que predispõe os peixes às doenças, estão a má nutrição, má qualidade da água (baixo oxigênio e elevados níveis de amônia tóxica e nitrito), acúmulo excessivo de resíduos orgânicos na água – servindo de substrato para a multiplicação bacteriana, manejo grosseiro causando perda de muco, escamas e lesões na pele e condições de temperatura da água. Este último influencia diretamente a resposta imunológica nas tilápias (KUBITZA, 2000; KUBITZA, 2005).

Temperaturas baixas inibem a resposta imune e a habilidade desses peixes em reagir a diferentes antígenos. A resposta imune das tilápias é praticamente inibida sob temperaturas ao redor de 16 e 18°C. No entanto, quando há uma elevação da temperatura no ambiente, as bactérias retomam de maneira mais rápida comparada à habilidade desses peixes em restaurar de forma eficiente o funcionamento do sistema imunológico. Isto explica maior incidência de doenças em tilápias nos períodos de inverno e início da primavera. Tilápias cultivadas à temperaturas entre 23 a 32°C, são menos propensas às doenças a não ser quando estão em ambiente de má qualidade (KUBITZA, 2000).

No Brasil, não há informações precisas sobre a dimensão das perdas devido às mortalidades causadas por bactérias, mas segundo Kubitza (2005), o autor afirma que pelo menos 5% dos peixes do tamanho de mercado morrem antes de completado o cultivo.

Mundialmente *Streptococcus* e *Francisella* são os agentes patogênicos de maior importância devida elevada patogenicidade. Este último tem causado sérios problemas de doenças na América Central, Canadá, e Havaí (PLUMB & HANSON, 2011). No Brasil, a septicemia causada por bactérias do gênero *Streptococcus* com maior prevalência do *S. agalactiae* genotipo II é também reconhecidamente a mais grave das patologias nas criações intensivas de tilápia com muitos casos frequentes de surtos pelo país, ocasionando quase sempre 100% de mortalidade naqueles cultivados em sistema de tanques-rede (PRIDGEON et al., 2013; MIAN et al., 2009; KUBITZA, 2008; SHERING-PLOUGH, 2007).

O *Streptococcus agalactiae* é um patógeno frequentemente associado à mastite bovina, meningites neonatais em humanos e meningoencefalite em peixes (PEREIRA et al.,

2010). Segundo Mian et al. (2009), atinge desde peixes juvenis com 54 g até adultos com mais de 1kg, levando à alta mortalidade em altas temperaturas ( $\geq 27^{\circ}\text{C}$ ) (Figura 1.).

Ainda do mesmo gênero, o *Streptococcus dysgalactiae*, é um conhecido agente patogênico causador também de mastites bovinas, endocardites em vários animais domésticos, faringites e doenças cardiopulmonares em humanos. Foi associado às doenças em peixes em 2002 por Nomoto et al. (2004) e era restrito a peixes marinhos. No entanto, mais recentemente, Costa et al. (2013) o isolou e identificou em tilápias cultivadas no país, nos estados do Ceará e Alagoas.

Da mesma família dos *Streptococcus*, o *Lactococcus garvieae* é considerado uma bactéria emergente e causadora de alta mortalidade (maior que 50%) (VENDRELL et al., 2006). Há pouco tempo, foi isolado de amostras de tilápias e pintados do Brasil. Essa foi a primeira evidência desse patógeno no país em peixes (EVANS et al., 2009). Até então no Brasil, essa bactéria havia sido isolada apenas de água de búfalas com mastite subclínica (TEIXEIRA et al., 1996). O que não se sabe ainda é se a presença desse patógeno é endêmica ou se foi introduzido (EVANS et al., 2009).

As doenças causadas pelos gêneros *Streptococcus* e *Lactococcus* apresentam os mesmos sintomas clínicos (Tabela 4.) e mesmos mecanismos de transmissão que podem ocorrer de forma horizontal, de peixe para peixe; através da contaminação na água por bactérias liberadas pelos peixes já mortos ou moribundos; via fecal-oral por rações preparadas com peixes contaminados e por penetração através de injúrias no peixe causadas por parasitas, como *Trichodina* ou por outras bactérias, como exemplo *Aeromonas* e *Edwardsiella* (PLUMB & HANSON, 2011).

Seguindo uma ordem de importância em nossa aquicultura, a *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas fluorescens*, são frequentes e conduzem à septicemias hemorrágicas em tilápias. Possuem sinais clínicos bem semelhantes e a ocorrência delas é maior em períodos de temperaturas baixas ou amenas. Nestas condições, a mortalidade e os prejuízos podem ser consideráveis. (KUBITZA, 2000)

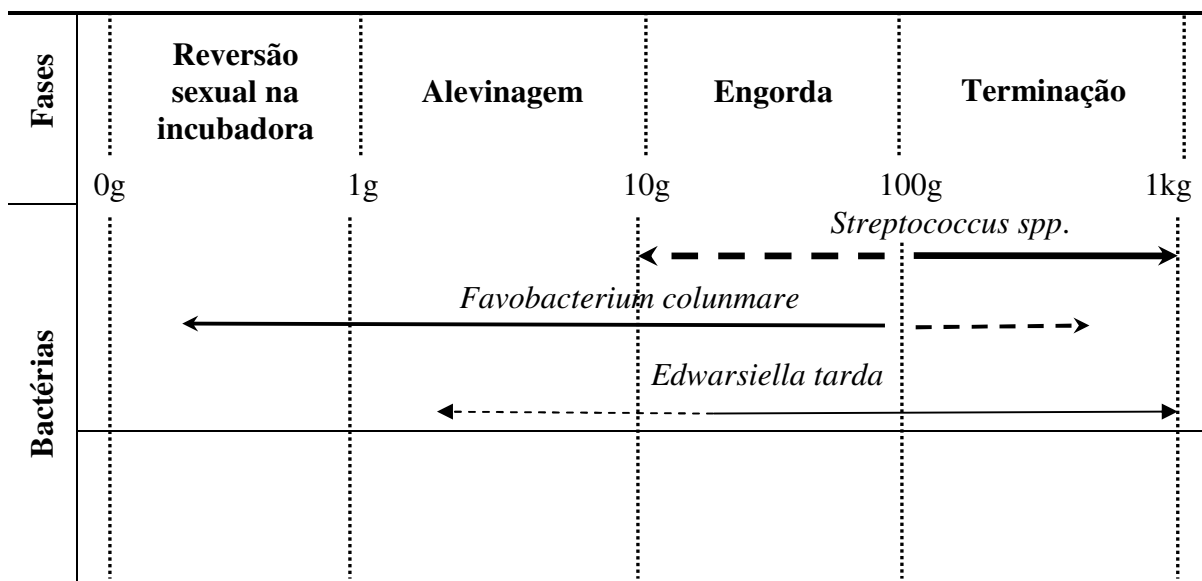
Além das citadas acima, a *Edwardsiella tarda*, largamente disseminada na natureza, já foi isolada no Brasil em tilápias de água doce. Com poucos casos identificados no país, causa doença não só no peixe como também provoca gastroenterites e outras doenças no homem. Frequentemente isolada do trato digestório das tilápias, são responsáveis por



infecções secundárias em peixes que pode levar à septicemia hemorrágica bacteriana, assim como as já comentadas pela *Aeromonas* e a *Pseudomonas*. Sua ocorrência está correlacionada à erros de manejo (KUBITZA, 2005; ALBINATI et al., 2006). (Tabela 4.).

Por último, a *Flavobacterium columnare* é também uma bactéria oportunista que habita normalmente os sistemas aquáticos e convive em pleno equilíbrio com os peixes. De importância econômica e bastante frequente na tilapicultura, é restrita às brânquias e superfícies externas do corpo do peixe. A incidência da doença é maior com temperaturas da água mais elevadas, entre 28 e 30°C e sua ocorrência também está associada a erros de manejo.

Ainda são escassas na literatura nacional informações precisas sobre as bacterioses em tilapicultura, assim como a realização de diagnósticos mais apurados que possam definir o agente envolvido. A manutenção de condições ambientais favoráveis, manejo adequado são formas de reduzir a prevalência e a disseminação de doenças em peixes (TAVARES & PALHARES, 2011).



Obs. A importância da doença é razoavelmente proporcional à largura das barras das setas

Figura 1. Bactérias patogênicas que acometem as diferentes fases do cultivo de tilápia no Brasil.

Um aspecto importante a se destacar no Brasil é que com a expansão da tilapicultura, houve uma procura pelos produtores por linhagens de melhor desempenho produtivo vindos de países de tradição de cultivo e detentores de técnicas de melhoramento genético destes peixes como a África e Ásia, respectivamente. No entanto, nestes países as tilápias já tem sido cultivadas intensivamente há décadas e, portanto, linhagens existentes já foram acometidas por muitas doenças e seguramente são portadoras de algum agente patogênico desconhecido por nós e possivelmente potenciais causadores de prejuízos. Por outro lado, o cultivo em países asiáticos somam anos de uso de antimicrobianos e assim, tilápias importadas destes países podem trazer consigo cepas bacterianas já resistentes a antimicrobianos permitidos no Brasil, havendo ainda a possibilidade de que peixes importados de outros países ou até mesmo transferidos de outras regiões do próprio país apresentem maior suscetibilidade a agentes patogênicos existentes e evoluídos daquele local para qual foram destinados. Desta forma, pode ocorrer de uma linhagem com ótimo desempenho venha apresentar problemas quando exposta ao desafio de novos agentes (KUBITZA, 2005). Portanto, a implantação de medidas de biossegurança como a quarentena dos peixes introduzidos somada às boas práticas sanitárias são de suma importância para a proteção dos peixes já cultivados aqui contra a introdução e disseminação de novos patógenos (TAVARES & PALHARES, 2011; ASSIS & FREITAS, 2012).

Tabela 4. Principais bactérias patogênicas na tilapicultura brasileira

Bactéria	Nome da doença	Sinais clínicos
Gram-negativas		
<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas veronii</i>		Lesões ulcerativas sobre o corpo; hemorragia na base das nadadeiras e aspectos de úlceras sobre o corpo; abdômen distendido; escamas eriçadas; exoftalmia
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Septicemia hemorrágica bacteriana	Sintomas clínicos semelhantes ao causados pela <i>Aeromonas</i>
<i>Edwarsiella tarda</i>		Lesões com exposição da musculatura; abscessos na musculatura com presença de gás e mau odor
<i>Flavobacterium columnaris</i>	Columnariose; podridão das nadadeiras; boca de algodão e podridão de brânquias	Podridão da cauda; podridão das brânquias; lesões esbranquiçadas ou com aspecto de tufo de algodão sobre o corpo e boca; lesões profundas na cabeça com exposição da musculatura e ossos
Gram-positivas		
<i>Streptococcus iniae</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Estreptococcose; meningoencefalite e septicemia hemorrágica	Anorexia, letargia, perda de orientação, natação errática, exoftalmia, corpo escurecido
<i>Lactococcus garvieae</i>	Lactococcose; meningoencefalite e septicemia hemorrágica	Sintomas clínicos semelhantes ao causados pelo <i>Streptococcus</i> sp.

### *Antimicrobianos na aquicultura*

Como já visto qualquer desequilíbrio dentro do ambiente aquático, seja pela excessiva densidade de estocagem, má qualidade da água ou má nutrição tem como consequência o aumento da incidência de problemas com doenças.

Doenças de origem bacteriana na aquicultura resultam quase sempre em grandes prejuízos econômicos devido às altas taxas de mortalidade que elas podem causar. O mais difícil é que diante de sintomatologias tão semelhantes entre as enfermidades causadas por bactérias, é extremamente necessário que um profissional de saúde, especialista em animais aquáticos identifique o agente patogênico e realize antibiogramas para que se certifique qual o melhor tratamento. Isso evita erros e minimiza o uso irracional de antimicrobianos na aquicultura. (LUCAS & SOUTHGATE, 2012).

Muitas ocorrências de doenças na piscicultura podem ser prevenidas e resolvidas com melhorias no manejo através de ajustes da densidade, monitoramento contínuo da qualidade da água, atenção a alterações de comportamento dos peixes, inspeção sanitária de rotina, entre outros. Todas essas medidas contribuem para reduzir a necessidade do uso de antimicrobianos (KUBITZA, 2005; CYRINO et al., 2010; ASSIS & FREITAS, 2012). Porém, é sabido que seu uso exacerbado na profilaxia de doenças é uma prática comum entre os produtores durante períodos em que os peixes estão mais sujeitos às condições de estresse, como por exemplo, nas mudanças da dieta, no transporte, no manejo, entre outros. A ocorrência dessa prática está associada principalmente em países em desenvolvimento onde não há regulamentação para o uso de medicamentos veterinários em ambientes aquáticos (GUARDABASSI et al., 2008; CARNEIRO et. al, 2007).

A FAO não recomenda o uso de antibióticos em nenhuma das situações, seja profilático, metafilático ou terapêutico. Porém, apresenta medidas de controle e tratamento para as principais bacterioses na aquicultura (Tabela 5.). Em contrapartida a OIE (*World Organisation for Animal Health*) reconhece a necessidade de acesso aos agentes antimicrobianos para os animais aquáticos, como importante ferramenta para o tratamento e controle de doenças infecciosas.

Desta maneira, há situações, sim, em que a terapia com agentes antimicrobianos é necessária e a mesma deve-se iniciar o quanto antes. Isto porque a demora de apenas alguns dias depois do aparecimento dos primeiros sinais de enfermidade pode significar a

diferença entre o sucesso e o fracasso de uma terapia (GAUNT, 2006). É importante mencionar que a maior parte dos tratamentos realizados com antimicrobianos é feito através da administração de rações medicadas com o antibiótico e em situações avançadas da doença, os peixes em sua maioria deixam de se alimentar e por isso a demora para o início do tratamento já o torna fracassado antes mesmo de iniciá-lo.

A OIE (2010) recomenda que a seleção do agente deva ser baseada no conhecimento e experiência do profissional de saúde. Assim como também deverá ser realizado teste de suscetibilidade para confirmar se a escolha está correta. Esse profissional é quem irá prescrever indicando a dose, o intervalo do tratamento, a duração, o período de carência e a quantidade de antimicrobiano que deverá ser oferecida dependendo da quantidade de animais. O uso *extra-label*<sup>1</sup> deverá ser permitido em circunstâncias apropriadas conforme a legislação em vigor. Suspeita de reações adversas, incluindo baixa eficácia deverá ser reportada às autoridade competentes, juntamente com os resultados do teste de suscetibilidade

Uma grande variedade de substâncias antimicrobianas é usada na produção animal em todo o mundo. Mesmo com a crescente ênfase na prevenção de doenças através de melhorias no manejo e nas condições ambientais, o sistema intensivo de produção animal ainda faz uso desses agentes terapêuticos pelo menos em alguma fase da produção.

A tabela 6., traz a relação de antimicrobianos utilizados na aquicultura mundial. Ela demonstra uma grande variedade de produtos o que não significa que todos sejam licenciados apenas para aqueles países e que associações utilizadas para determinadas doenças não devam ser tomadas de base para concluir que há dados confiáveis de eficácia. Da mesma forma, os autores que formularam essa tabela, reforçam em dizer que a indicação feita para uma dada espécie não pode ser utilizada para outra que esteja num ambiente diferente. Infelizmente a escolha desses agentes terapêuticos não está baseada em dados científicos obtidos de estudos clínicos e de eficácia e sim por questões econômicas e de disponibilidade (GUARDABASSI et al., 2008).

É notável o uso extensivo de antimicrobianos na aquicultura por países asiáticos, os quais são responsáveis por 90% da produção da aquicultura global (FAO, 2012).

---

<sup>1</sup> Segundo FDA (1994), *extra-label* é definido como: uso atual ou pretendido de um fármaco num animal, de uma maneira que não está em conformidade com a rotulagem aprovada.

Recentemente, Rico et al. (2013), através de pesquisa realizada com 252 produtores de diversos países asiáticos como Bangladesh, China, Tailândia e Vietnã, verificou que 9,7% das fazendas tailandesas e 16% das fazendas chinesas, ambas produtoras de tilápias, fazem uso concomitante de até dois antimicrobianos como enrofloxacina (69% dos produtores usam), florfenicol (63%), sulfametoxazol com trimetoprima (44%) e doxiciclina (34%) entre outros que na sua maioria administram os antimicrobianos através da ração num período de 5 a 8 dias, sendo que em apenas 5% dos locais de cultivo realizam o uso profilático.

Em especial, o uso de fluoroquinolonas na aquicultura foi banido pelos Estados Unidos e Canadá. Mundialmente, sabe-se que seu uso ainda é feito e permitido em países asiáticos nos cultivos de tilápia (China e Tailândia) e principalmente em pangásius no Vietnã. No entanto, com a identificação de amostras de pangásius com valores de resíduos de enrofloxacina acima do valor permitido por países compradores do peixe como Estados Unidos, Japão e Canadá, acredita-se que o uso deste antimicrobiano seja banido pelo governo vietnamita o que não inclui outros países asiáticos (RICO et al., 2013).

Tabela 5. Produtos aprovados para uso em peixes.

Produtos	Concentração	Forma de tratamento	Duração	Período de carência	bacterioses
Permanganato de potássio	2 – 4ppm 4 – 10ppm	Imersão Imersão	indefinido 1 hora		Profilaxia nos casos de MAS* e columnariose
Formalina	20 - 25ppb 167ppb	Imersão Imersão	indefinido 1 hora		Infecções externas
Sulfato de cobre Cloramina T	0,5 – 3ppm 10 – 20ppm	Imersão Imersão	indefinido 1 hora por 3 dias		
Oxitetraciclina	50 mg kg <sup>-1</sup> /dia	Ração medicada	12 a 14 dias	21 dias	Infecções sistêmicas como estreptococose e edwardsielose MAS e columnariose <sup>+</sup>
Sulfametoxazol+ormetoprima	50 mg kg <sup>-1</sup> /dia	Ração medicada	5 dias	42 dias	MAS e edwardsielose <sup>+</sup>
Eritromicina	50 mg kg <sup>-1</sup> /dia	Ração medicada	12 dias		
Amoxicilina	50 – 80 mg kg <sup>-1</sup> /dia	Ração medicada	10 dias		
Florfenicol	10 mg kg <sup>-1</sup> /dia	Ração medicada	10 dias	12 dias para bagre americano; 14 dias para salmonídeos <sup>+</sup> 14 dias para tilápia e 135°C dia para a truta <sup>#</sup>	MAS <sup>#</sup> ; estreptococose <sup>#</sup> columnariose <sup>+</sup>

\* MAS – septicemia por *Aeromonas* móvel; <sup>+</sup>Estados Unidos ; <sup>#</sup>Brasil / Adaptado da FAO, 2005 e LUCAS & SOUTHGATE, 2012.

Tabela 6. Agentes antimicrobianos e suas aplicações na aquicultura mundial.

Antimicrobiano		Indicação		Licença para espécies aquáticas
Classe	Fármaco	Espécies	Doenças	Países
β-lactâmicos	Amoxicilina	Salmonídeos, robalo, dourado, cauda amarela, bagre, enguia, tilápia	Furunculose, doenças bacterianas nas brânquias, pasteurelose, edwardsielose, estreptococose	Reino Unido, Romênia, Itália, Grécia
	Oxitetraciclina e Clortetraciclina	Salmão, bagre americano, carpas, espécies marinhas, peixes ornamentais	Vibriose, pasteurelose, flexibacteriose, infecções com bactérias segmentadas columnaris, yersiniose, vibriose em águas frias, botulismo, infecções por <i>Pseudomonas</i> , infecções por <i>Aeromonas</i> , estreptococose	Países da EU, maioria dos países da Ásia, Estados Unidos, Canadá, Japão
Quinolonas e Fluoroquinolonas	Ácido nalidíxico	Salmonídeos, enguia, dourado, peixes ornamentais	Furunculose, vibriose, infecções por <i>Pseudomonas</i>	Japão
	Ácido oxolínico	Salmonídeos, enguias, carpas, dourado, rodovalho	Infecções por <i>Pseudomona</i> , infecções por <i>serratia</i> , edwardsielose, vibriose, vibriose em águas frias, furunculose	Dinamarca, Grécia, França
	Flumequina	Salmonídeos, espécies marinhas, peixes ornamentais	Vibriose, pasteurelose, flexibacteriose, furunculose, yersiniose	Noruega, Islândia e Bulgária
	Enrofloxacin	Salmonídeos, peixes ornamentais	Doenças bacterianas renais, vibriose, furunculose, estreptococose	Croácia, República Tcheca e França
	Sarafloxacin	Salmonídeos, bagre americano	Furunculose, yersiniose, edwardsielose	Hungria, Itália, Letônia e Eslováquia



Continuação da Tabela 6.

Macrolídeos	eritromicina	Salmonídeos, cauda amarela	Estreptococose, lactococose, doenças bacterianas renais, piscinquetsiose, infecções por <i>Clamidia</i> ,	Japão
	espiramicina e josamicina	Cauda amarela	estreptococose	Reino Unido, Irlanda, Letônia
Anfenicóis	florfenicol	Salmonídeos, espécies marinhas, enguias, peixes ornamentais	Infecções por <i>Flavobacterium psychrophilum</i> , furunculose, vibriose, flexibacteriose, pasteurelose, edwardsielose	Eslovênia, Noruega, Bulgária, Dinamarca, Lituânia
Sulfonamidas	sulfamerazina	Salmonídeos de águas frescas	furunculose	
	sulfadimetoxina	Truta arco-íris, bagre americano		
	sulfadimidina	Salmonídeos de águas frescas, carpas		
Sulfonamidas potencializadas	trimetoprima + sulfadiazina ou sulfametoxazol	Salmonídeos, peixes ornamentais, bagres, espécies marinhas	Infecções por <i>Aeromonas</i> , yersiniose, edwardsielose, vibriose, pasteurelose	Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Dinamarca, Croácia, Noruega, França, Eslovênia, Itália, Grécia, Alemanha
	ormetoprima + sulfametoxazol	Salmonídeos, bagre americano	Furunculose, edwardsielose	Estados Unidos

23

Fonte: GUARDABASSI et al., 2008

### *Enrofloxacin: aspectos farmacológicos em peixes*

As quinolonas constituem um extenso grupo de antibióticos sintéticos eficazes no combate de diversas doenças em animais domésticos e animais produtores de alimentos (BOTSOGLOU & FLETOURIS, 2001).

Exercem seu efeito antibacteriano através da inibição da DNA-girase (topoisomerase, tipo II), responsável pela separação dos dois filamentos de DNA da dupla hélice, essencial para a replicação ou transcrição do DNA bacteriano (LIZONDO et al., 1997; BUFFÉ et al, 2001).

Os ácidos oxolínico e nalidíxico são os mais antigos do grupo das quinolonas de primeira geração e ainda até hoje largamente utilizados na profilaxia de doenças bacterianas na piscicultura. Já as fluoroquinolonas, como a enrofloxacin (ENR), flumequina (FLU) e sarafloxacin (SAR) descobertas posteriormente, são também bem difundidas na piscicultura apesar de não serem todas permitidas e regulamentadas para uso.

A principal diferença entre quinolonas e fluoroquinolonas é a presença um átomo de flúor no C-6 e um grupo piperazinil no C-7 nas fluoroquinolonas. Essas modificações levaram a significativas mudanças na atividade antimicrobiana, no perfil farmacocinético e nas propriedades metabólicas das novas fluoroquinolonas. (LODE et al., 1998). Na figura 2, estão apresentadas a estrutura da enrofloxacin e seu metabólito (CIP).

Os grupos coplanares do carbonil (C=O) nas posições 3 e 4 são os responsáveis pelas atividades antimicrobiana das fluoroquinolonas. O átomo de flúor na posição 6, 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 (BARROS et al., 1996).

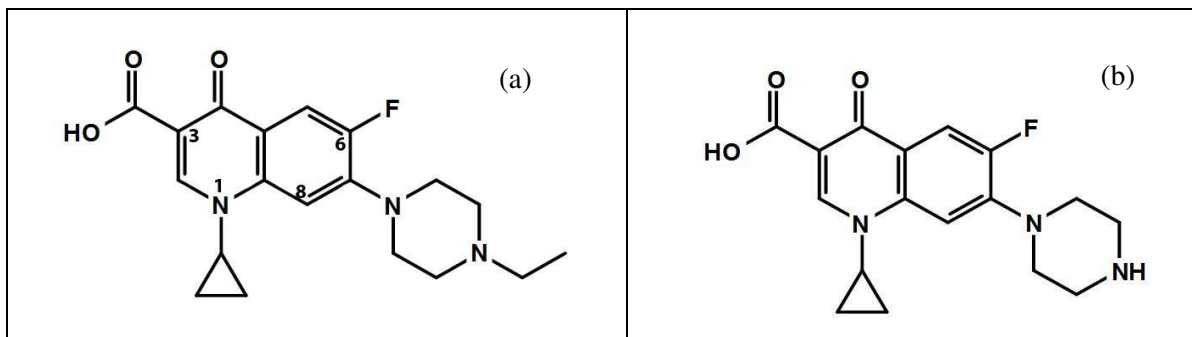


Figura 2. Estrutura molecular da enrofloxacin (a) e seu metabólito, ciprofloxacin (b).

A ENR foi a primeira fluoroquinolona aprovada para exclusiva utilização veterinária. Foi introduzida no mercado em 1988 e se tornou a quinolona mundialmente mais importante no tratamento de infecções em cães e gatos incluindo o tratamento de infecções resistentes a antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos e sulfonamidas (BAYER, 1999; VALGAS, 2005).

É um agente de amplo espectro contra bactérias gram-positivas, negativas e micoplasmas sensíveis a ela. Por ter efeito bactericida, ocasionar morte bacteriana concentração-dependente e ainda possuir efeito pós-antibiótico contra a maioria de patógenos gram-negativos é amplamente utilizada na terapêutica veterinária para bovinos, suínos, ovinos e caprinos em diversas infecções do trato urinário, respiratório e da pele, causados por *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Pasteurella* spp, *Klebsiella* spp., *Mycoplasma* spp, entre outros (LODE et al., 1998; KIM & NIGHTINGALE, 2000; MARTINEZ et al., 2006).

Na aquicultura mundial a ENR é usada para o tratamento de processos de septicemia generalizado causados por *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio agullarum*, *Yersinia ruckeri*, *Renibacterium salmoninarum* e *Pasteurella piscicida*, apresentando-se superior a outros antimicrobianos como sulfadiazina-trimetoprima e oxitetraciclina (BOWSER & BABISH, 1991; SAMANIDOU et. al,2008).

Tabela 7. Propriedades físico-químicas da enrofloxacin.

<b>Propriedades físico-químicas</b>	
Fórmula molecular	$C_{19}H_{22}FN_3O_3$
Peso molecular	359.39
Descrição	crystal amarelo pálido
Ponto de fusão	219 – 221°C
pKa	$\left\{ \begin{array}{l} pK_{a1}: 6.0 \\ pK_{a2}: 8.8 \end{array} \right.$
Solubilidade	pouco solúvel em água no pH 7.0

Fonte: USP, 2003.

De caráter anfótero, a ENR, possui dois valores de  $pK_a$ . O primeiro  $pK_a$  está associado ao ácido carboxílico enquanto que o segundo é atribuído à amina terciária presente na molécula. De maneira geral em pH abaixo do  $pK_{a1}$ , apresentam-se protonadas, carregadas positivamente e em pH acima do  $pK_{a2}$ , carregadas negativamente (Tabela 7.). Com algumas exceções, as fluoroquinolonas exibem pouca solubilidade nos fluidos aquosos entre pH 6 e 8, apresentando-se de moderadamente lipofílicas (ciprofloxacina), à altamente lipofílicas (enrofloxacina) (WANG et al., 2012)

O transporte passivo realizado por essas moléculas está associado a sua lipofilicidade relativa aos seus dois  $pK_{as}$ . Portanto, em meios com pH entre  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$ , na forma de *zwitterion*, íon dipolar, podem atravessar livremente por difusão passiva as membranas biológicas e as porinas das células bacterianas (MARTINEZ et al., 2006).

Outra característica é a capacidade com que elas conseguem se acumular dentro das células de defesa como macrófagos e neutrófilos. Ao contrário de outros antibióticos, as quinolonas são distribuídas para dentro do citosol das células, o que permite alcançarem patógenos intracelulares. Isso permite explicar as altas concentrações desse antibiótico nos tecidos infectados. Essa é uma característica específica desse grupo de antibiótico que as tornam eficazes, mesmo em condições adversas, nos locais de infecção, na presença de abscessos (LIZONDO et al., 1997; MARTINEZ et al., 2006; USP, 2003; WANG et al., 2012).

A respeito das propriedades farmacocinéticas (PK) e farmacodinâmicas (PD) da ENR em peixes, essas começaram a ser avaliadas através de estudos clínicos no começo da década de 90 (BOWSER & BABISH, 1991) e desde então uma série de estudos farmacocinéticos em diversas espécies de peixes, tem sido publicada ao longo desses anos. Na tabela 8, há uma pequena parcela do que já foi publicado sobre ENR em peixes. Observa-se que a maioria das espécies é originária da Europa. Com relação à tilápia-do-Nilo, objeto de estudo deste trabalho, na tabela 9., apresenta-se apenas dois trabalhos de farmacocinética de dose única. Nenhum com ENR.

Por serem animais pecilotérmicos, os peixes dependem muito do seu habitat, a água. A composição (controle osmótico e regulação ácido-base) e a temperatura da água exercem forte influência na respiração e em suas atividades metabólicas. Em geral, em águas de temperaturas baixas, a absorção e excreção são mais lentas e isso poderá ser variável

dependendo do fármaco de estudo (REIMSCHUESSEL et al., 2005). Contudo, haverá impactos significativos nos processos farmacocinéticos (DI GIULIO & HINTON, 2008; KUBITZA, 1999). Exemplos de fármacos como sulfadimidina, trimetoprima e oxitetraciclina em peixes, tem suas meias-vidas até três vezes mais longas em temperaturas baixas (10 a 12°C) se comparado em temperaturas mais altas (20 a 25°C) (GUARDABASSI et al., 2008).

A particularidade de cada espécie, a via de administração, a formulação do produto e/ou as condições de saúde do animal são também fatores que devem ser considerados. Qualquer alteração num desses fatores, modificará a resposta farmacocinética de modo significativo (Tabela 10) (BOWSER & BABISH, 1991; CHEN & BOWSER, 2005; GUARDABASSI et al., 2008).

Cabe destacar que há uma grande dificuldade em estimar os parâmetros de PK em peixes por causa da maneira de como os ensaios clínicos são conduzidos. Como muitas vezes a administração do fármaco se faz através de ração medicada, amplas variações interindividuais das concentrações do fármaco no plasma e nos tecidos se tornam inevitáveis (GUARDABASSI et al., 2008).

Como características comuns à classe das quinolonas, a ENR apresenta boa biodisponibilidade oral (> 30%) na maioria das espécies monogástrica (WANG et al., 2012), altos valores no volume de distribuição (1.0-4.0 L/kg), baixa ligação às proteínas e tempos de meia-vida variáveis conforme a espécie: muito curtos para coelhos (1.8-2.5h para ENR), intermediários para bovinos, ovinos e suínos (2.0-8.0h) e longos para peixes, variando de 22h para a truta-marrom à 131.0h para o salmão do Atlântico. Tempos de meia-vida também são longos em répteis, de 36h à 55h em jacarés (USP, 2003; WANG et al., 2012). Sua biotransformação ocorre no fígado e em particular a ENR, dá origem a um metabólito ativo, a ciprofloxacina (CIP), fármaco utilizado na medicina humana (Figura 2).

A biotransformação da ENR varia entre as espécies e inclui reações de n-desalquilação, conjugação glicurônica do azoto na posição *para* do anel piperazinil, oxidação na posição *orto* em relação ao substituto amina e abertura do segundo anel piperazinil (MITCHELL, 2006). Muitas espécies a biotransformam em CIP, a exemplo animais domésticos como cães e gatos e outros animais como os bovinos, suínos, ovinos, entre outros. As maiores conversões de ENR em CIP são particularidades dos cães (40%) e

dos bovinos (35%). Porém as menores ocorrem em suínos (<10%) e em peixes, nos quais em algumas espécies como a dourada (*Sparus aurata L.*) (DELLA ROCCA et al., 2004) truta-marrom (*Salmo trutta fario*) (KOC et al., 2009) e Silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) (FANG et al., 2011) não a biotransformam em CIP o que sugere outras vias metabólicas, porém ainda não elucidadas em peixes (USP, 2003; WANG et al., 2012).

A ocorrência da presença de dois picos de concentração da ENR no plasma e portanto, a obtenção de dois tempos máximos (FANG et al., 2011; Tabela 8), sugere a possibilidade de circulação entero-hepática da ENR em alguns peixes.

A principal via de excreção da ENR é renal por filtração glomerular e secreção tubular, mas também pode ser via biliar através da circulação entero-hepática, um mecanismo comum de excreção das fluoroquinolonas. Isso explica o aumento do  $T_{1/2}$  e a AUC desses fármacos, contribuindo dessa maneira para a ocorrência de múltiplos picos de concentração .

Os aspectos farmacodinâmicos da ENR em peixes pouco tem sido reportado através da variável CIM (concentração inibitória mínima).

A CIM fornece um índice quantitativo da eficácia e potência do fármaco. Esse índice é obtido de ensaios *in vitro* e é definido como a menor concentração que inibe por completo o crescimento bacteriano (GUARDABASSI et al., 2008).

Os primeiros valores de CIM para enrofloxacin frente aos patógenos mais comuns em peixes são datados do começo da década de 90. De lá para cá pouco foi publicado nesse assunto. O trabalho de Dalsgaard & Bjerregaard (1991) é o mais citado dentre todas as publicações consultadas. Nele, os valores de CIM<sub>90</sub> para *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* e *Vibrio anguillarum* são respectivamente, 0.025  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0.006  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0.012  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0.005  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 0.032  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Ainda a respeito dos valores de CIM, próximo à data de publicação de Dalsgaard & Bjerregaard (1991), Bragg & Todd (1988) citado por Bowser & Babish (1991) obtiveram valores de CIM diferentes para os mesmos microrganismos de peixes: *Aeromonas hydrophila*, 0.002  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , *Aeromonas salmonicida*, 0.006  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , *Yersinia ruckeri*, 0.007  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e *Streptococcus sp*, 0.34  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

A definição de valores de CIM deve ser muito criteriosa. Parte das diferenças apresentadas aqui podem ser explicadas pelas variações dos métodos microbiológicos empregados, assim como a origem dos isolados em peixes e a formulação do produto.

Atualmente já existe disponível um guia com métodos específicos para testes de suscetibilidade com bactérias isoladas de organismos aquáticos, publicado pela CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) através do guia VET<sub>04</sub>-A.

Tabela 8. Algumas propriedades farmacocinéticas da enrofloxacin em peixes após administração em dose única.

Espécie de peixe	T°C	Via e dosagem (mg kg <sup>-1</sup> )	V <sub>d</sub> (L kg)	CL <sub>T</sub> (L h kg)	T <sub>1/2 β</sub> (h)	AUC µg-h mL	C <sub>máx.</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	T <sub>máx.</sub> (h)	F (%)	Referência
Silver crucian carp ( <i>Carassius auratus gibelio</i> )	25	via oral (ração) 10	-	-	62.7	205.9	C <sub>1</sub> = 4.5 ± 1.03 C <sub>2</sub> = 4.06 ± 1.36	T <sub>1</sub> = 2 T <sub>2</sub> =12	86	FANG et al., 2011
Truta-marrom ( <i>Salmo trutta fario</i> )	10	via oral (ração) 10	-	-	22	54.95	2.30 ± 0.08	8	78	KOC et al., 2009
Carpa comum ( <i>Koi carp</i> )	27	via oral (gavagem) 10	1.5	-	16.6	156.4	14.4 ± 7.7	0.25	19.6	UDOMKUSONSRI et al., 2007
Korean catfish ( <i>Silurus asotus</i> )	25	via oral (gavagem) 10	-	-	34	39	1.2 ± 0.2	3.44	65	KIM et al., 2006
Robalo ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	15	via oral (gavagem) 5	-	-	25	65.93	1.39 ± 0.67	8	-	INTORRE et al., 2000
Salmão do Atlântico ( <i>Salmo salar</i> )	10	via oral (ração) 10	-	-	34.2	40.2	1.54	6	55.5	MARTINSEN & HORSBERG, 1995
alevinos de Truta arco-íris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	15	via oral (gavagem) 10	-	-	56.3	154.77	1.28	8	48.8	BOWSER et al., 1992

V<sub>d</sub> = volume de distribuição; CL<sub>T</sub> = depuração corporal total; T<sub>1/2 β</sub> = tempo de meia-vida de eliminação; AUC = área sob a curva de concentração plasmática versus tempo; C<sub>máx.</sub> = concentração plasmática máxima; T<sub>máx.</sub> = tempo de concentração plasmática máxima; F = biodisponibilidade.



Tabela 9. Algumas propriedades farmacocinéticas de agentes antimicrobianos em tilápias (22 - 30°C).

Agente terapêutico	Via e dosagem (mg/kg)	Amostra	V <sub>d</sub> (L kg)	CL <sub>T</sub> (L h kg)	T <sub>1/2 β</sub> (h)	AUC μgh mL	C <sub>máx.</sub> (μg mL <sup>-1</sup> )	T <sub>máx.</sub> (h)	F (%)	Referência
florfenicol	via oral (gavagem) 10mg kg <sup>-1</sup>	plasma	-	-	10.03	86.68	4.46	12	-	FENG & JIA, 2009
		músculo	-	-	10.97	-	6.88	-	-	
oxitetraciclina	IV 10mg kg <sup>-1</sup>	plasma	-	-	8.4	359.28	-	-	-	CHEN & BOWSER, 2005
		músculo	-	-	32.64	251.52	-	-	-	

V<sub>d</sub> = volume de distribuição; CL<sub>T</sub> = depuração corporal total; T<sub>1/2 β</sub> = tempo de meia-vida de eliminação; AUC = área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo; C<sub>máx.</sub> = concentração plasmática máxima; T<sub>máx.</sub> = tempo de concentração plasmática máxima; F = biodisponibilidade; IV = intravenosa

31

Tabela 10. Algumas propriedades farmacocinéticas da enrofloxacina em salmão do Atlântico (*Salmo salar*) a 10-12°C

Referência	Via e dosagem (mg/kg)	V <sub>d</sub> (L kg)	CL <sub>T</sub> (L h kg)	T <sub>1/2 β</sub> (h)	AUC μgh mL	C <sub>máx.</sub> (μg mL <sup>-1</sup> )	T <sub>máx.</sub> (h)	F (%)
MARTINSEN & HORSBERG, 1995	IV (10)	6.1	0.14	34.2	72.4	1.54	6	55
	oral (10)				40.2			
STOFFREGEN et al., 1997	ração oral (10) gavagem	-	-	105.1	41.7	0.27	0.42	49

V<sub>d</sub> = volume de distribuição; CL<sub>T</sub> = depuração corporal total; T<sub>1/2 β</sub> = tempo de meia-vida de eliminação; AUC = área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo; C<sub>máx.</sub> = concentração plasmática máxima; T<sub>máx.</sub> = tempo de concentração plasmática máxima; F = biodisponibilidade; IV = intravenosa

### *Os riscos à saúde pública e ao ambiente no uso da enrofloxacina*

Os agentes antimicrobianos são importantes para a saúde e bem-estar dos humanos e dos animais (OIE, 2010). Porém, quando se faz mau uso deles pode-se resultar no desenvolvimento de resistência por parte de alguns patógenos e conseqüentemente, agentes terapêuticos que antes eram eficazes, começam a não surtir mais efeito. Assim, as opções de tratamento tornam-se mais escassas e muitas vezes mais caras também (KUBITZA, 2005).

Na aquicultura com o número restrito de agentes licenciados, tem essa situação mais agravada pelo uso *extra-label* desses agentes. A grande quantidade e variedade de antimicrobianos que são administrados indiscriminadamente através de ração na profilaxia e tratamento de doenças tem sido associada ao aparecimento de resistência de bactérias nos animais, na transmissão desses microrganismos resistentes para humanos e na transferência de genes de bactérias resistentes não patogênicas aos organismos aquáticos, porém patogênicos ao homem (KÜMMERER, 2009; SAPKOTA et al., 2008; OIE, 2010). E ainda, a alta densidade de estocagem e conseqüentemente o aumento do contato físico entre os peixes tem sido apontada como fator preponderante para uma alta frequência de troca de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, codificadores de resistência (RHODES et al., 2000, citado por LIMA et al., 2005).

Poucos são os estudos que caracterizam a ocorrência de resistência bacteriana em ambientes aquícolas, particularmente em climas tropicais. No Brasil, Lima et al.(2006) caracterizaram como baixa a frequência de resistência a antimicrobianos em bactérias oriundas de ambiente de criação e de filés de tilápias. Dos 124 isolados provenientes do ambiente de criação e de filés congelados, a predominância de bactérias pertencentes às famílias *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae* se apresentaram resistentes principalmente à ampicilina e eritromicina.

O uso responsável de antimicrobianos inclui medidas realizadas por agências reguladoras para a redução do risco associado com a seleção e disseminação de microrganismos resistentes. Como exemplo, a desaprovação da ENR em aves, inicialmente, nos Estados Unidos, pela FDA e posteriormente por outros países (Austrália e Canadá) devido a identificação de casos de resistência em *Campylobacter* e *Salmonella* (WANG et al., 2012; GUARDABASSI et al., 2008; LUCHETTI et al., 2004).

Assim, é necessário manter eficaz o antimicrobiano na medicina humana e na medicina veterinária, assegurando seu uso racional afim de garantir eficácia e segurança em ambos (OIE, 2010). A problemática do uso desenfreado de antimicrobianos não se resume apenas ao desenvolvimento de resistência. Os resíduos desses medicamentos veterinários têm implicações para a segurança ambiental, alimentar humana e no comércio internacional de produtos alimentares de origem animal. Por isso, a avaliação da existência de resíduos dessas moléculas no ambiente (água e sedimentos) e na carne dos peixes é necessária para avaliar a importância dessa questão nos contextos ambientais e de segurança alimentar, respectivamente.

A ausência de dados confiáveis, com rigor científico, gera incertezas e especulações a respeito dos impactos ambientais gerados pelo uso dos antimicrobianos na aquicultura. Pouco é conhecido sobre o destino e o comportamento dessas substâncias no ambiente aquático, assim como não está claro quais organismos são afetados e em que grau (PILARSKI & SAKABE, 2009).

Na natureza, as quinolonas não se degradam por hidrólise e nem com altas temperaturas, porém se degradam facilmente sob a luz UV (KÜMMERER, 2009). Os trabalhos de STURINI et al., (2010) e BABIĆ et al. (2013), reportam que em ambientes aquáticos, a degradação de fluoroquinolonas como a marbofloxacina e enrofloxacina é completa após 1 hora sob exposição solar e que suas reações de fotodegradação não são afetadas pela presença de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{Cl}^-$ , mas sim, aceleradas na presença de fosfatos.

A literatura relativa à presença das quinolonas nos ambientes como resultado de seu uso veterinário é escassa. Wang et al. (2012) cita trabalhos que já detectaram traços de flumequina, ácido oxolínico e sarafloxacina em sedimentos em fazendas de peixes e vestígios de enrofloxacina no solo. Ainda em outro, realizado no Reino Unido, demonstra o comportamento de sorção da danofloxacina e sarafloxacina no solo como sendo fármacos de pouca mobilidade e grande persistência.

Sobre ainda a permanência desses compostos na natureza, na China, em recente estudo de Li et al. (2014) demonstrou que o acúmulo dessas moléculas (norfloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina) por frutos como a berinjela, o tomate e o pimentão é muito maior do que pelos vegetais folhosos como o espinafre quando adubados com esterco de animais tratados com esses antimicrobianos.

No Brasil, estudo comparativo entre a sorção da ENR no solo e na cama de frango, comprovou que a sorção da ENR no solo é superior à cama de frango, ocorrendo forte ligação quase que irreversível com o solo reforçando ser uma fonte de poluição ambiental importante e de boa persistência (LEAL et al., 2012). O que chama atenção é que a utilização profilática da ENR no Brasil é realizada pela maioria dos produtores de frangos de corte, isso indica o quanto essas moléculas através de adubo orgânico podem estar presentes em nossa alimentação quando associamos esses resultados com os obtidos por Li et al. (2014) citado anteriormente (BRASIL, 2005).

E ainda, se considerarmos que outras espécies, além do frango, também tratadas com ENR, excretam parte do fármaco na forma inalterada através das fezes e urina diretamente no solo ou indiretamente como adubo, possivelmente a somatória de todos os resíduos poderá ser considerado um alerta. Por isso, fazer uso consciente desse agente terapêutico na medicina veterinária, significa também dizer menos resíduo para o ambiente e para o alimento consumido.

#### *Aspectos regulatórios e de inspeção envolvendo antimicrobiano*

A regulamentação de medicamentos veterinários em países desenvolvidos é realizada conforme a regulamentação nacional, que busca qualidade e segurança em produtos avaliados durante seu processo de aprovação. Isso assegura que carne e outros produtos derivados de animais tratados com medicamentos veterinários aprovados não estejam contaminados por resíduos farmacológicos (REEVES, 2007).

Vários são os estudos necessários para o licenciamento/registro de substâncias antimicrobianas em animais produtores de alimentos para o consumo humano. Dentre eles, o estabelecimento da segurança e eficácia do princípio ativo, que avalia os riscos à saúde do animal, daqueles que consumirão o produto e do meio ambiente (SPISSO, 2007). Para tanto, dados farmacológicos obtidos de estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos são partes necessárias para a elaboração de um regime terapêutico eficaz com menores riscos de seleção de bactérias resistentes (GUARDABASSI et al., 2008).

Os requisitos para registro de novos produtos veterinários tem sido padronizados em âmbito internacional pela VICH (*International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products*) estabelecida em 1996 sob

amparo da OIE com representação do governo e da indústria dos países participantes (União Européia, Japão e Estados Unidos). A elaboração de guias e protocolos de estudos clínicos veterinários propostos pela VICH auxiliarão os países na autorização e desenvolvimento de novos produtos veterinários.

Com relação ao Brasil, o registro de produtos veterinários é de competência do MAPA que através da Portaria SDA nº 74 de 11/06/1996, apresenta um roteiro com todas as exigências a serem cumpridas para fins de obtenção de registro. No entanto, não expõe de maneira clara e nem sugere a quem seguir na realização dos estudos clínicos em animais (BRASIL, 2012c).

Segurança alimentar é um tema cada vez mais relevante devido à crescente busca por uma melhor qualidade de vida e conscientização dos consumidores do mundo todo quanto ao direito de adquirir produtos seguros à saúde e a presença de resíduos de medicamentos veterinários pode apresentar um risco, caso não sejam observadas as boas práticas, seja em função do uso em exagero e/ou indevido, do não cumprimento do período de carência, entre outros fatores (SPISSO, 2007).

Neste contexto, 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 dos mesmos. O JECFA é o órgão científico que assessora o Codex Alimentarius em assuntos relacionados aos resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, e que estabelece valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) e de Limites Máximos de Resíduos (LMR) para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal.

O LMR é definido como a concentração máxima de resíduo tolerável no alimento, resultante do seu uso. É baseado no tipo e quantidade de resíduo que não induz efeito adverso à saúde humana considerando-se a Ingestão Diária Aceitável (IDA) do composto. A IDA é a quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem que provoque danos à saúde. Ela é expressa em  $\text{mg kg}^{-1}$  de peso corpóreo. A determinação da IDA é baseada nas informações toxicológicas disponíveis daquele composto na época da avaliação (JECFA, 2008).

As recomendações do JECFA são adotadas pelo Codex com o 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 adotadas pelo país. Atualmente, poucos países estabelecem limites máximos para resíduos de medicamentos veterinários em peixes. Portanto, o monitoramento dos níveis de resíduos em produtos derivados da piscicultura, comercializado no país e exportado, é de fundamental importância para assegurar não somente a saúde dos consumidores como também para evitar barreiras às exportações, proporcionando o desenvolvimento da atividade aquícola no Brasil e, em consequência, protegendo a população envolvida na cadeia produtiva.

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 – PNCRC. O plano previa a adoção de programas setoriais de controle de remanescentes residuais em carne, leite, mel e pescado em decorrência do uso de defensivos agrícolas 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 carne estava implementado. A Portaria Ministerial nº 50 de 20/02/2006, estendeu a implementação do PNCRC para as outras fontes de carne (bovina, aves, suína e eqüina), leite, mel, ovos e pescado no exercício de 2006.

É importante citar que o MAPA atualiza anualmente a lista de substâncias a serem monitoradas. Nessa questão, em 2010, através da Instrução Normativa de nº8 de abril, pela primeira vez incluiu na lista de antimicrobianos a serem monitorados para pescado a enrofloxacina e seu metabólito (ciprofloxacina). No entanto, até os últimos resultados divulgados das amostragens realizadas (Instrução Normativa nº7 de 27 de março de 2013), nenhuma das 121 amostras analisadas de pescado de cultivo apresentou não conforme para nenhuma das fluoroquinolonas investigadas (Tabela 11.).

Tabela 11. Subprograma de monitoramento de resíduos e contaminantes para quinolonas em peixe de cultivo (PNCRC/2013).

Antimicrobianos	Matriz	LMR ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	nº de ensaios
enrofloxacina		Soma da enrofloxacina e ciprofloxacina igual a 100	
sarafloxacina	Músculo	30	60
difloxacina		300	
ácido nalidíxico		20	
ácido oxolínico		20	
flumequina		600	

Fonte: BRASIL, 2013b

*Relação PK/PD: um caminho para o uso racional de antimicrobianos na aquicultura.*

O aumento da incidência de resistência aos antimicrobianos, as exigências dos consumidores e a melhor compreensão da ação dos antimicrobianos tem incentivado agências internacionais a reverem o uso dos mesmos.

Três fatores principais tem incentivado a essa revisão na utilização de antimicrobianos em animais. Em primeiro lugar, a seleção inexorável de bactérias resistentes a medicamentos veterinários disponíveis e "mais particularmente" no homem. Somado a isso, há uma crescente evidência de que as bactérias selecionadas para resistência em animais podem ser transmitidas ao homem, onde elas podem causar doença ou transmitir o material genético responsável pela resistência para bactérias patogênicas humanas.

Além disso, a aquisição de bactérias resistentes ultrapassou a capacidade da indústria farmacêutica para produzir novos produtos com mecanismos de ação que superem essas bactérias, como é evidenciado pela crescente série de infecções bacterianas no homem. No entanto, é claro que na maioria das infecções humanas resistentes que são difíceis de tratar é derivada de bactérias selecionadas para resistência no homem e não de animais (OMS, 2001). Enquanto isso, a sofisticação do mercado de consumo em países

desenvolvidos faz com que os sistemas de produção sejam comprovadamente favoráveis à saúde e bem-estar animal, e onde através da fiscalização verifica-se que o mínimo uso de antimicrobianos e consequente diminuição de resíduo no produto consumido tem ganhado popularidade.

Diante disso, compreensão mais detalhada das relações entre a farmacocinética (PK) dos antimicrobianos na espécie-alvo e sua ação sobre patógenos-alvos [farmacodinâmica (PD)] levou a uma maior sofisticação no regime posológico a fim de melhorar a atividade e reduzir a pressão seletiva para a resistência na terapia antimicrobiana. Isto, por sua vez, é importante para o desenvolvimento de fármacos antimicrobianos, assim como na sua seleção dependendo da utilidade clínica. Garantir a penetração do fármaco em concentração suficiente no local de infecção (PK) e conhecer a potência e eficácia do fármaco (PD) contra microrganismos infectantes levam ao sucesso da terapia antimicrobiana (McKELLAR et al., 2004; TOUTAIN & LEES, 2004; SAMUELSEN, 2006;)

O emprego de índices PK/PD tem sido amplamente utilizado na medicina humana. No entanto, na medicina veterinária está na sua infância. Apesar das agências reguladoras ainda não darem total crédito a essa diferente abordagem para racionalização do uso de antimicrobianos na medicina veterinária, a comunidade científica tem demonstrado que eles são claramente adequados e exequíveis (TOUTAIN & LEES, 2004). Talvez a maior utilidade para PK/PD além da racionalização de dosagens, seja na determinação de estratégias de administração ideal, na total concepção do regime terapêutico. Assim, não só a absoluta quantidade do fármaco necessária para tratar uma infecção pode ser determinada, mas também a forma com que o fármaco se comporta no plasma ou no tecido para efetuar o tratamento adequado. É uma ferramenta extremamente versátil que pode ser usada de uma maneira muito mais eficaz e menos dispendiosa do que os estudos de titulação de dose em modelo de animais (McKELLAR et al., 2004).

Como base farmacológica para aperfeiçoar a dosagem para a morte bacteriana e minimizar o risco de resistência, três índices de PK/PD ligados à concentração máxima tem sido propostos para a CIM: (i) razões de  $AUC_{0-24}/CIM$ , (ii)  $C_{max}/MIC$  e (iii)  $T > CIM$  (Figura 3.).

Valores de CIM (concentração inibitória mínima) são frequentemente medidos *in vitro*. Esta medida é usada extensivamente na prática clínica para determinar quais



antimicrobianos podem ser usados para tratar uma infecção causada por um patógeno específico que tenha sido isolado (TASSO, 2008).

Ao aplicar valores de CIM para modelos PK/PD, três fatores devem ser considerados: (i) a concentração média necessária para inibir a bactéria em laboratório (*in vitro*) pode não ser a mesma no hospedeiro (*in vivo*); (ii) qualquer valor numérico de qualquer CIM *in vitro* depende do protocolo do teste utilizado para sua determinação e (iii) na modelagem de PK/PD, é a CIM que caracteriza as cepas sensíveis (GUARDABASSI et al., 2008).

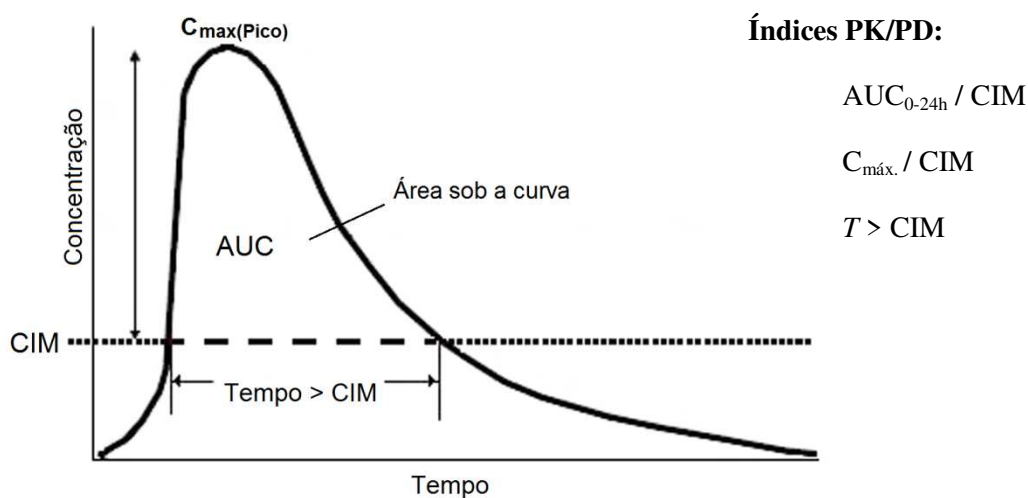


Figura 3. Relações PK/PD empregados na avaliação da eficácia de antimicrobianos (TASSO, 2008).

Os antimicrobianos podem ser classificados como concentração-dependente e tempo-dependente. Quando o aumento das concentrações no *locus* da infecção aumenta a morte bacteriana, ele é chamado de concentração-dependente e quando o tempo de exposição da bactéria ao fármaco é quem determina o efeito obtido, é considerado tempo-dependente. Para este último grupo, o aumento da concentração absoluta obtida acima de um limiar não melhorar sua eficácia (GUARDABASSI et al., 2008; McKELLAR et al., 2004).

Alguns fármacos como as fluoroquinolonas e aminoglicosídeos são concentração-dependentes e outros como  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos, lincosamidas e glicopeptídeos são

tempo-dependentes. Para medicamentos de outras classes, há informações limitadas e contraditórias sobre a sua classificação.

Com relação às fluoroquinolonas, as mesmas como já dito, possuem perfil de efeito concentração-dependente, a proporção  $AUC_{0-24}/CIM$  é a que melhor se correlaciona com a eficácia e  $C_{max}/CIM$  para prevenção de resistência (DELLA ROCCA et al., 2004; GUARDABASSI et al., 2008). Assim tem-se demonstrado para este grupo de antimicrobianos que para melhor eficácia do regime terapêutico e o mínimo risco de resistência, deve ser obedecido a relação  $AUC_{0-24h}/CIM$  entre 125-250 e  $C_{max}/CIM$  entre 10-12 (ALIABADI & LEES, 2000).

É importante destacar que na aquicultura mundial, até o momento, não foram estabelecidos limites relevantes do ponto de vista clínico para os testes de suscetibilidade (CIM) gerados a partir de bactérias associadas a doenças em animais aquáticos e devida a essa escassez de informações, correlacionar dados de PK/PD se torna impraticável (TASSO, 2008; GUARDABASSI et al., 2008).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O Brasil possui grandes potencialidades para se tornar um dos maiores produtores e exportadores de peixes no mundo, particularmente de tilápias. Isso é realidade já demonstrada nos últimos estudos realizados pela FAO. No entanto, se não houver desenvolvimento científico no país a partir de agora, os elevados números de produção sugeridos pela FAO ficarão mais distantes a serem alcançados. Para tanto, a realização de pesquisas científicas devem ocorrer em todo o âmbito da aquicultura e percorrerem caminhos juntos e em paralelo.

No mundo, há poucos medicamentos licenciados para uso na aquicultura e muitos utilizados sem autorização. Isto se justifica pela falta de estudos clínicos e de conhecimento teórico e prático sobre esse assunto em organismos aquáticos. Há falta de dados que demonstrem eficácia e segurança no animal, no produto de origem dele e dos impactos que podem ser causados no ambiente.

Problemas relacionados à sanidade em piscicultura podem ser amenizados com a adoção de boas práticas de manejo na produção. Isso tem benefícios econômicos

relacionados ao aumento da sobrevivência, mas também economia na racionalização do uso de produtos terapêuticos. A manutenção de condições favoráveis, manejo adequado e implantação de medidas de biossegurança são formas de reduzir a prevalência e a disseminação de doenças na tilapicultura. Porém, quando não cumpridos, os agentes antimicrobianos são uma necessidade e não podem ser vistos como vilões.

É preciso ficar atentos com a globalização da tilápia que vem proporcionando a transferência de pós-larvas, alevinos e matrizes de diversos países, favorecendo a rápida disseminação de agentes patogênicos para os quais ainda não estamos preparados para lidar. Por isso é necessário que governo e o setor público desenvolvam e implementem boas práticas na aquicultura, e forneçam subsídios para a criação de leis e regulamentos alinhados com normas e diretrizes internacionais relativos à licenciamentos e uso de medicamentos veterinários na aquicultura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBINATI, A. C. L; ALBINATI, R. C. B; OLIVEIRA, E. M. D; LABORDA, S. S.; VIDAL, L. V. O. Edwarsielose em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Rev. Bras. Saúde Prod**, An.v. 7, n. 2, p. 164-168, 2006.
- ALIABADI, F.S; LEES, P. Antibiotic treatment for animals:effect on bacterial population and dosage regimen optmisation. **International Journal of Antimicrobial Agents**.n. 14, p. 307-313, 2000.
- ANUALPEC, 2007 - Anuário da Pecuária Brasileira. **Para onde vai a tilápia?** Disponível em: <<ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/tilapia.pdf>>. Acesso em: abr. de 2013.
- ANUALPEC, 2011 – Anuário da Pecuária Brasileira. **Criação de tilápias cresce vigorosamente no Brasil.** Disponível em: <[ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/Tilapia\\_2011.pdf](ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/Tilapia_2011.pdf)>. Acesso em: abr. de 2013.
- ASSIS, M. C.; FREITAS, R. R. Análise das práticas de biossegurança no cultivo de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em região estuarina no sudeste do Brasil. **Revista da Gestão Costeira Integrada**.v. 12, n. 4, p. 559-568, 2012.
- BABIĆ, S.; PERIŠA, M.; ŠKORIĆ, I. Photolytic degradation of norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media. **Chemosphere**. v.91,n. 11, p. 1635-1642, 2013.

BARROS, E.; BITTENCOURT, H.; CARMORI, M.L.; MACHADO, A. **Antimicrobianos Consulta Rápida**. 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996, 110-117 p.

BAYER. Baytril – History. Disponível em <<http://www.animalhealth.bayer.com/5135.0.html>>. Acesso em: março de 2011

BOTSOGLOU, N. A.; FLETOURIS, D. J. **Drug Residue in Foods: pharmacology, food safety and analysis**. Marcel Dekker, 2001, 1155p.

BOWSER, P. R.; BABISH, J. G. Clinical pharmacology and efficacy of fluoroquinolones in fish. **Annual Rev. of Fish Diseases**. p. 63-66, 1991.

BOWSER, P. R.; WOOSTER G. A; LEGER, J.; BABISH, J. G. Pharmacokinetics of enrofloxacin in fingerlings rainbow trout. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**.v..15, 62-71p, 1992.

BRAGG, R. R.; TODD, J. M. In vitro sensitivity to Baytril of some bacteria pathogenic to fish. **Bull. Eur. Ass. Fish Pathol**. v. 8, n. 1, p. 5-6, 1988.

BRASIL, 2005. Ministério da Saúde. ANVISA / PAMVet – PR. **Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frango de corte**. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigilancia%20sanitaria/Relatorio%20levantamento%20frango.pdf>>. Acesso em: 10 abril. 2012

BRASIL, 2012a. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura – Brasil 2010**. Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/topicos/300-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2010>> Acesso em: 20 set. 2012.

BRASIL, 2012b. Ministério da Pesca e Aquicultura **.Valor Econômico destaca crescimento do mercado de pescado no Brasil**. <<http://www.mpa.gov.br/index.php/imprensa/noticias/1109-valor-economico-destaca-crescimento-do-mercado-de-pescado-no-brasil>>

BRASIL, 2012c. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação Relacionada a Produtos Veterinários. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/leg\\_prod\\_veterinarios\\_WEB.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/leg_prod_veterinarios_WEB.pdf)>

BRASIL, 2013a. Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio - MDIC/ AliceWeb <http://aliceweb2.mdic.gov.br//index/home>

BRASIL, 2013b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº17, DE 29 MAIO DE 2013. Disponível em:

<[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/CRC/IN%2017-2013\(FINAL\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2017-2013(FINAL).pdf)>. Acesso em julho de 2013.

- BUFFÉ, C; ARAÚJO, B. V.; DALLA COSTA, T. Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos na otimização de terapias antimicrobianas. **Caderno de Farmácia**. v. 17, n. 2, p.97-109, 2001.
- CARNEIRO, D. O; FIGUEIREDO, H. C. P; JUNIOR, D. J. P; LEAL, C. A. G; LOGATO, P. V. R. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-Nilo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, n. 4, p.869-876, 2007.
- CHEN, C.Y.; BOWSER, P. R. Pharmacokinetics of Oxytetracycline in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* Challenged with *Streptococcus iniae* and *Vibrio vulnificus*. **Journal of the Aquaculture Society**. n. 36, p. 262-270, 2005.
- COSTA, F. A. A; LEAL, C. A. G; LEITE, R. C; FIGUEIREDO, H. C. P. Genotyping of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from Nile tilapia. **Journal of Fish Disease**.p. 1-7, 2013.
- 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**. v. 39, p. 68-87, 2010.
- DALSGAAD, I; BJERREGAARD, J. Enrofloxacin as an antibiotic in fish. **Acta Veterinaria Scandinavica**. n.87, p.300-302, 1991.
- DELLA ROCCA, G.; DI SALVO, A.; MALVISI, J.; SELLO, M. The disposition of enrofloxacin in seabream after single intravenous injection or from medicated feed administration. **Aquaculture**. n. 232, p. 53-62, 2004.
- DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **The Toxicology of Fishes**. Taylor & Francis Group, Estados Unidos, 2008,1003p.
- EC, 2002. European Commission. *Official Journal of the European Communities*:17/08/2002, L221/8-36.
- EMEA, 2007. European Medicines Agency. Disponível em <<http://www.emea.europa.eu/index/indexv1.htm>>. Acesso em dez. de 2007.
- EVANS, J. J; KLESIUS, P. H; SHOEMAKER, C. A. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, and pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*. **Journal of Fish Disease**. n.32, p 943-951, 2009.

- FAO, 2005 - *Fisheries and Aquaculture Department Cultured Aquatic Species Information Programme*. Disponível em: <[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis\\_niloticus/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en)> Acesso em jun. de 2013.
- FAO, 2009 - **FAO revela aposta na aquicultura para os países em desenvolvimento**. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/FAOraappd.asp>>. Acesso em jan. de 2013.
- FAO, 2012 - The State of World Fisheries and Aquaculture, 2012. <<http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e00.htm>>. Acesso em jun de 2013.
- FAO, 2013 - Fisheries and Aquaculture Department. Global Aquaculture Production Statistics for the year 2011. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/FI/news/GlobalAquacultureProductionStatistics2011.pdf>>. Último acesso em abr. de 2013.
- FDA, 1994 - Animal Medicinal Drug Use Clarification Act of 1994 (AMDUCA). Disponível em: <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/ActsRulesRegulations/ucm085377.htm>>. Acesso em: jul. de 2013.
- FANG, X.; LIU, X.; LIU, W; LU. C. Pharmacokinetics of enrofloxacin in allogynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**.n. 35,p.397-401, 2011.
- FENG, J. B.; JIA, X. P.; Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) held in freshwater at 22°C. **Aquaculture**. n. 289, p. 129-133, 2009.
- FISH, R. D. Withdrawal time estimation of veterinary drugs: extending the range of statistical methods. **J. Vet. Pharmacol. Therap.** v. 23, p.159-162, 2000
- FITZSIMMONS, K. 2010. Tilapia: 2009 State of the Industry Report. WAS2010, San Diego,CA. Disponível em: <<https://www.was.org/WasMeetings/Meetings/SessionAbstracts.aspx?Code=AQ2010&Session=31>>. Acesso em jun de 2010.
- FREITAS, T. **Brasil ainda é promessa em pescados de cativeiro**. Disponível em: <[http://www.pesca.sp.gov.br/noticia.php?id\\_not=11836](http://www.pesca.sp.gov.br/noticia.php?id_not=11836)> Acesso em ago. de 2013
- GAUNT, P. Veterinarian's role in the use of veterinary feed directive drugs in aquaculture. **Journal of the American Veterinary Medical Association**.n. 229, p. 1-3, 2006.
- GUARDABASSI, L; JENSEN, L. B; KRUSE, H. **Guia de antimicrobiano em veterinária**. Porto Alegre, 2008. 266p.

- HANSON, H; CUI, L; ZOU, S; CLARKE, G; MULDOON, J.; POTTS, H.; **Greening China's Fish and Fish Products Market Supply Chains**. International Institute for Sustainable Development (2011) Disponível em: <<http://www.iisd.org/publications/pub.aspx?id=1477>> Acesso em abr. de 2013.
- INTORRE, L.; CECCHINI, S.; BERTINI, S.; COGNETTI VARRIALE, A. M.; SOLDANI, G.; MENGOZZI, G. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass. **Aquaculture**. n.182, p.49-59, 2000.
- JECFA - Joint Expert Committee on Food Additives: Disponível em: <<http://jecfa.ilsa.org/section1.htm#1>> Acesso em abr. de 2008.
- KIM, M.K; NIGHTINGALE, C. H. **The Quinolones**. 3ª edição.2000, 169-202p
- KIM, M. S.; LIM, J. H; PARK, B. K; HWANG, Y. H; YUN, H. I. Pharmacokinetics of enrofloxacin in Korean catfish. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**.v.29, p.397-402, 2006.
- KOC, F; UNEY, K; ATAMANALP, M; TUMER, I; KABAN, G. Pharmacokinetic disposition of enrofloxacin in brown trout (*Salmo trutta fario*) after oral and intravenous administrations. **Aquaculture**, n. 295, p.142-144, 2009.
- KUBITZA, F., 1999. Nutrição e Alimentação das Tilápias – Parte 2 – Final. **Panorama da AQUICULTURA**, maio/junho, p.41-49.
- KUBITZA, F., 2000. Principais parasitoses e doenças em tilápias. **Panorama da AQUICULTURA**, julho/agosto, p.39-53.
- KUBITZA, F., 2005. Antecipando-se às doenças na tilapicultura. **Panorama da AQUICULTURA**, maio/junho, p.15-23.
- KUBITZA, F., 2007. Tilápias na Bola de Cristal. **Panorama da AQUICULTURA**, janeiro/fevereiro, p. 14-21.
- KUBITZA, F., 2008. Tilápia na mira dos patógenos. **Panorama da AQUICULTURA**, maio/junho.
- KUBITZA, F; CAMPOS, J. L; ONO, E. A; ISTCHUK, P. I. Panorama da piscicultura no Brasil: estatística, espécies, polos de produção e fatores limitantes à expansão da atividade. **Panorama da AQUICULTURA**, julho/agosto, p.14-25, 2012.
- KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**.n.75, p. 417-434, 2009.

- LARSEN, J; MATTHEW, J. **Farmed Fish Production Overtakes Beef**. Disponível em:<[http://www.earth-policy.org/plan\\_b\\_updates/2013/update114](http://www.earth-policy.org/plan_b_updates/2013/update114)>. Acesso em: jun. de 2013.
- LEAL, R. M. P.; FIGUEIRA, R. F.; TORNISIELO, V. L.; REGITANO, J. B. Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from São Paulo state, Brazil. **Science of the Total Environment**.n.432, p.344-349, 2012.
- LI, X.W; X, Y.F.; LI, C.L.; ZHAO, H.N.; ZHAO, H.; WANG, N.; WANG, J. F. Investigation of residual fluoroquinolones in a soil-vegetables system in an intensive vegetable cultivation area in Northern China. **Science of the Total Environment**.468-469, 258-264p, 2014.
- LIMA, R. M. S; FIGUEIREDO, H. C. P; FARIA, F. C; PICOLLI, R. H; FILHO, J. S. S. B; LOGATO, P. V. R. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).**Ciênc. agrotec, Lavras**. v. 30, n. 1, p. 126-132, 2006.
- LIZONDO, M.; PONS, M.; GALLARDO, M.; ESTELRICH, J. PhysicoChemical properties of enrofloxacin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. n. 15: p. 1845 – 1849, 1997.
- LODE, H.; BORNER, K.; KOEPPE, P. Pharmacodynamics of fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases**. n.27, p. 33-39, 1998.
- LUCAS, J. S; SOUTHGATE, P. C. **Aquaculture: farming aquatic animals and plants**. 2ª edição, 2012, 338-364p
- LUCCHETTI. D; FABRIZI, L; GUANDALINI, E; PODESTÀ, E; MARVASI, L; ZAGHINI, A; CONI. E. Long depletion time of enrofloxacin rainbow trout. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.48, n. 10, 3912-3917p, 2004.
- MARTÍN-JIMÉNEZ, T.; RIVIERE, J. E. Population pharmacokinetics in veterinary medicine: Potencial use for therapeutic drug monitoring and prediction of tissue residues. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v.21, 167-189p, 1998.
- MARTINSEN, B.; HORSBERG, T. E. Comparative single-dose pharmacokinetics of four quinolones, oxolinic acid, flumequine, sarafloxacin and enrofloxacin in Atlantic salmon held in seawater at 10°C. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**.v. 39, p.1059-1064, 1995.
- McKELLAR, Q. A.; SANCHEZ BRUNI, S. F.; JONES, D. G. Pharmacokinetic/pharmacodynamic of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**.v.27, p.503-514, 2004.



- MIAN, G. F; GODOY, D. T; LEAL, C. A. G; YUHARA, G. M; COSTA, G. M; FIGUEIREDO, H. C. P. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**. n.13, p.180-183, 2009.
- MITCHELL, M. A. Enrofloxacin. **Journal of Exotic Pet Medicine**. v. 15, n. 1, p. 66-69, 2006.
- NOMOTO, R.; UNOSE, N; SHIMAHARA, Y; YASUDA, H.; NAKAMURA, A.; MISAWA, N; ITAMI, T.; KAGAWA, H.; YOSHIDA, T. *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. **Journal of Fish Diseases**.n.27, p. 673-682, 2004.
- OLIVEIRA, E; SANTOS, F. J. S.; PEREIRA, A. M. L.; LIMA, C. B. **Produção de tilápia: Mercado, espécie, biologia e recria**. Circular Técnica, 45. MAPA – Embrapa Meio Ambiente, 2007, 12p.
- OLIVEIRA, R. C. O panorama da aqüicultura no brasil: a prática com foco na sustentabilidade. Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade. v.2, n.1,p.71-89, 2009.
- OIE - *World Organisation for Animal Health*. **Aquatic Animal Health Code**. Paris, França. 13ªedição, 2010, 324p.
- ONU – Organização das Nações Unidas. **Aquacultura tem potencial para combater a pobreza e insegurança alimentar**. Disponível em < <http://www.onu.org.br/fao-aquacultura-tem-potencial-para-combater-a-pobreza-e-inseguranca-alimentar/>> Acesso em abr. de 2013
- OMS – Organização Mundial da Saúde. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Publicación científica y técnica, nº 580, 2001, 420p.
- OSTRENSKY, A; BORGHETTI, J. R; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**, Brasília, 2008, 276p.
- PEREIRA, U. P; MIAN, G. F; OLIVEIRA, I. C. M; BENCHETRIT, L. C; COSTA, G. M; FIGUEIREDO, H. C. P. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**: 140, p, 186-192, 2010.
- PILARSKI, F.; SAKABE, R. Principais Enfermidades Diagnosticadas no Estado de São Paulo: Profilaxia ou Tratamento? 2009.
- PLUMB, J. A; HANSON, L. A. Health Maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. 3ª edição. 2011, 445-463p.

- PRIDGEON, J. W.; KLESIUS, P. H.; YILDIRIM-AKSOY, M. Attempt to develop live attenuated bacterial vaccines by selecting resistance to gossypol, proflavine hemisulfate, novobiocin, or ciprofloxacin. **Vaccine**. n. 31, p.2222-2230, 2013.
- REEVES, P. T. Residues of veterinary drugs at injection sites. **J. Vet. Pharmacol. Therap.** v. 30, p.1-17, 2007.
- RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, J.; MACGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P.; PICKUP, R. Distribution of oxytetracycline plasmids between *Aeromonas* in hospital and aquaculture environments: implications of Tn 1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant. **Applied Environmental Microbiology**. n.6, p. 4908-4915, 2000.
- REIMSCHUESSEL, R.; STEWART, L.; SQUIBB, E.; HIROKAWA, K.; BRADY, T.; BROOKS, D.; SHAIKH, B.; HODSDON, C. Fish drug analysis-Phish-Pharm: A searchable database of pharmacokinetics data in fish. **The AAPS Journal**. v.7, n.2, p.E288-E293, 2005.
- RICO, A.; PHU, T. M.; SATAPORNVANIT, K.; MIN, J.; SHAHABUDDIN, A. M.; HENRIKSSON, P.J. G.; MURRAY, F. J.; LITTLE, D. C.; DALSGAARD, A.; BRINK, V. Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. **Aquaculture**.v. 412-413 p. 231-243, 2013.
- SAMANIDOU, V. EVANGGELOPOULOU, E.; TRÖZZMÜLLER, M; GUO, X.; LANKMYR, E. Multi-residue determination of seven quinolones antibiotics in gilthead seabream using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A.**, n.1203, p 115-123, 2008.
- SAMUELSEN, O. B. Pharmacokinetics of quinolones in fish: a review. **Aquaculture**. n. 255, p.55-75, 2006.
- SAPKOTA, A.; SAPKOTA, A. R; KUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER, P.; LAWRENCE, R. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**. n.34, p.1215-1226, 2008.
- SHERING-PLOUGH. Principais doenças bacterianas em criações comerciais de peixes no Brasil. **Boletim técnico**, 2007, 8p.
- SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURN S, V.; ALVES JÚNIOR, A. J.; MUNGIOLI, R. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial – Agroindústria**. n . 35, p. 421-463, 2012.

- SPISSO, B. F. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Instituto nacional de controle de qualidade em saúde**. Disponível em <[http://www.abrasco.org.br/cienciasaudecoletiva/artigos/artigo\\_int.php?id\\_artigo=1640](http://www.abrasco.org.br/cienciasaudecoletiva/artigos/artigo_int.php?id_artigo=1640)> Acesso em jan. de 2009.
- STURINI, M; SPELTINI, A.; MARASCHI, A.; PROFUMO, A.; PRETALI, L.; FASANI, E.; ALBINI, A. Photochemical degradation of marbofloxacin and enrofloxacin in natural waters. **Environmental Science & Technology**. v.44, n.12, p.4564-4569, 2010.
- TAVARES, G. C; PALHARES, M. M. Epidemiologia, diagnóstico e controle das principais bacterioses que afetam a tilapicultura no Brasil. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas**. n.110, p. 40-46, 2011.
- TASSO, L. **Modelagem farmacocinética-farmacodinâmica das fluorquinolonas levofloxacino e gatifloxacino**. Tese (Doutor em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 115p, 2008.
- TOUTAIN, P. L.; LEES, P. Integration and modeling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**.v.27, p.467-477, 2004.
- TEIXEIRA, L. M.; MERQUIOR, V. L. C.; VIANNI, M. C. E.; CARVALHO, M. G.S.; FRACALANZZA, S. E. L.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J. & FACKLAM, R. R. - Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**,n.46, p.664-668, 1996.
- UDOMKUSONSRI, P; ARTHITVONG, S; KLANGKAEW, N; KUSUCHARIT, N. Pharmacokinetics of enrofloxacin in Koi Carp (*Cyprinus carpio*) after various routes of administration. **Kasetsart Journal: Nature Science**. n.41, p. 62-68, 2007
- 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.; CASTAGNOLLI, N. (Eds.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. Sociedade Brasileira de Aquicultura e biologia Aquática. Editora Tecart, São Paulo, 2004, 171-193p.
- USP – Veterinary Pharmaceutical Information Monographs. **Fluoroquinolones veterinary-systemic**, 87-108p, 2003.
- VALGAS, S. **Desenvolvimento de um novo sistema de liberação controlada do fármaco enrofloxacina a partir de microesferas de malonilquitosana a ser aplicado**

**em medicina veterinária.** Tese (Doutora em Química Orgânica) – Química, Universidade Estadual de Santa Catarina, 139p, 2005.

VENDRELL, D; BALCÁZAR, J. L; RUIZ-ZARZUELA, I.; BLAS, I; GIRONÉS, O; MÚZQUIZ, J. L. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**.n. 29, p. 177-198, 2006.

WANG, J; MacNEIL, J. D.; KAY, J. F. **Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food**. 1ª edição. John Wiley & Sons, Inc, Estados Unidos, 2012, 347p

## CAPÍTULO II

### **Ração medicada com enrofloxaciná através de revestimento polimérico para uso na piscicultura**

*Este capítulo será submetido para publicação na Revista Brasileira de Zootecnia*



## **Ração medicada com enrofloxacinina através de revestimento polimérico para uso na piscicultura**

### **RESUMO**

A maioria dos tratamentos medicamentosos na piscicultura é feito através da administração de rações medicadas. A prática nas criações é recobrir a ração com uma mistura feita de óleo vegetal ou de peixe com o medicamento. A opção em usar polímero ao invés de óleo para o tem como principal vantagem, melhor uniformidade e aumento da resistência física do grânulo, o que contribui na diminuição da lixiviação não só do medicamento como também dos nutrientes da ração para a água. Para tanto foi preparado uma ração medicada através do revestimento com PVP (polivinilpirrolidona) com 0,1% de enrofloxacinina (ENR). Foi desenvolvido e validado método analítico para o doseamento do fármaco na ração utilizando HPLC-FLD. O método desenvolvido atendeu às exigências do Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários do MAPA (2011). O teor de ENR na ração produzida foi de 1.047 mg g<sup>-1</sup> de ENR.

Palavras-chave: antimicrobiano; ração medicada; peixe; cromatografia líquida; validação.

## **Feed medicated with enrofloxacin through polymeric coating for use in aquaculture**

### **ABSTRACT**

Most drug treatments in fish farming is done with feed medicated administration. The success of therapy depends using these diets is that the drug shall be well distributed on the surface of the diet. The option of using polymer instead oil for coating the feed with the drug has the major advantage of uniformity and increase the resistance of the granule which contributes to, not only reduce leaching of the drug, as well as the nutrient losses for water. For that was prepared feed medicated by coating with PVP-K30 with 0.1% ENR and also developed and validated analytical method for the determination of enrofloxacin in the feed (HPLC-FLD). The method developed has met the requirements of the MAPA and the product obtained was homogeneous with  $1.047 \text{ mg g}^{-1}$  of ENR.

Keywords: enrofloxacin; medicated feed; fish; liquid chromatography; validation.



## INTRODUÇÃO

A maioria das bactérias e outros patógenos encontram-se naturalmente presentes nos ambientes aquáticos e sua erradicação é praticamente impossível. Desta forma, a implantação de boas práticas, o uso de vacinas e terapias medicamentosas tornam-se ferramentas valiosas dentro do manejo sanitário das propriedades quando surtos de doenças ocorrem.

No mundo todo, somente em alguns países existe regulamentação quanto ao uso de agentes terapêuticos na piscicultura. Com algumas variações, os antibióticos autorizados para uso na aquicultura são a oxitetraciclina, florfenicol, sarafloxacin, eritromicina e sulfonamidas associadas com trimetoprima ou ormetoprima (SERRANO, 2005).

Atualmente, no Brasil, apenas dois antibióticos de uso veterinário estão registrados e regulamentados para uso na piscicultura: o florfenicol e a oxitetraciclina (BRASIL, 2013; CPVS-SINDAN, 2013). Além desses, outros não regulamentados ou registrados para outras espécies animais também tem sido administrados de maneira imprudente e irracional.

Aprovada para uso veterinário no final da década de 80 (MARTINEZ et al., 2006), a enrofloxacin (ENR) é um antibiótico não licenciado em muitos países para o uso na aquicultura, inclusive no Brasil. No entanto, é largamente usada por apresentar amplo espectro de ação, efeito bactericida em baixas concentrações, boa penetração nos tecidos e fluidos corporais. Devido a essas características, segundo Danyi et al (2010), tem sido fármaco de escolha para muitos tratamentos de doenças de peixes e camarões.

Os tratamentos com antimicrobianos na piscicultura podem ser realizados por injeção, imersão ou através de ração medicada. Esta última, por sua vez, pelo seu baixo custo se torna mais conveniente, sendo a principal via de administração (SAMUELSEN, 2006).

A ração pode ser formulada com o medicamento nas próprias fábricas de ração antes do processo de extrusão ou de peletização ou ainda, a opção mais escolhida, ser recoberta superficialmente com a adição de óleo-medicamento depois de pronta no local de criação (SHAO, 2001; SHERING, 2013 e PHIBRO, 2013). Essa é sem dúvida, a técnica mais utilizada pelo produtores. Ela alia praticidade e rapidez na formulação do produto, exclui a possibilidade de contaminação cruzada nas linhas de produção de ração na

indústria e o óleo contribui para uma melhor palatabilidade da ração. Porém, o uso excessivo de óleo para melhorar a adesão das partículas do medicamento à ração, leva a um desbalanceamento nutricional da dieta e os riscos de erros na manipulação dessas rações nos locais de produção são maiores devido a não fiscalização no cumprimento das boas práticas de fabricação.

Na indústria farmacêutica a técnica de revestimento é bem difundida e se faz em comprimidos, grânulos ou pós por inúmeros motivos: proteção física e química ao princípio ativo, mascaramento de sabores desagradáveis e obtenção de sistemas de liberação controlada. Podem ser revestidos com açúcar e com películas poliméricas por meio da irrigação ou aspersão da solução nas drageadeiras ou em leitos fluidizados (ANSEL et al., 2000). Dentre as películas poliméricas, o PVP (polivinilpirrolidona) é empregado em diversas formulações farmacêuticas como agente de suspensão em soluções orais (utilizado mais que 5%) e em comprimidos como agregante, diluente e agente de cobertura ou revestimento (utilizado entre 0.5-5%) (ROWE et al., 2009).

O sucesso da terapia medicamentosa com o uso de rações medicadas depende da ingestão da quantidade certa do alimento pela população-alvo a fim de que as concentrações terapêuticas sejam alcançadas. Para tanto, também é necessário que o medicamento esteja na superfície da ração de forma bem uniforme.

A opção em se usar polímero e não óleo para recobrir a ração com o fármaco tem como principal vantagem a uniformidade e o aumento da resistência física do grânulo que por sua vez, tem como outra vantagem diminuir a lixiviação não só do medicamento como também dos nutrientes da ração para a água. Assim, o objetivo do presente trabalho, foi preparar uma ração medicada com 0,1% de ENR através do revestimento com PVP e desenvolver, validar método analítico para quantificação da ENR em cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FLD) no produto formulado.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Reagentes e materiais**

Acetonitrila (ACN) da J.T. Baker (Philipsburg, EUA) e metanol (MeOH) da Honeywell Burdick & Jackson (Muskegon, EUA) de grau HPLC. Ácido fórmico da Acros Organics (New Jersey, EUA), ácido acético glacial da Qhemis (São Paulo, Brasil) e álcool etílico da Labsynth (São Paulo, Brasil) todos de grau analítico. Polivinilpirrolidona (PVP – K30) obtido da Henrifarma (São Paulo, Brasil). Durante este estudo, utilizou-se água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). As fases móveis foram filtradas utilizando membranas com uma porosidade de 0,22 µm de fluoreto de polivinilideno (PVDF) e politetrafluoretileno (PTFE) (Millipore, EUA). Os extratos finais foram filtrados em filtros de PVDF de 0,22 µm (Millipore, EUA).

### **Equipamentos**

Na etapa de revestimento foram usados os seguintes equipamentos: (i) pulverizador manual da marca Vonder (São Paulo, Brasil) para aspersão da solução; (ii) misturador, Mobilgear, modelo Mobil 636 (Lancashire, Reino Unido), adaptado a um secador de cabelos (Daihatsu, Brasil) funcionando como uma drageadeira.

A trituração e homogeneização das amostras foram feitas em processador de alimentos, modelo 600W da Philips Walita (Barueri, São Paulo Brasil) e em agitador de tubos - vórtex, marca Phoenix Luferco, modelo AP-56 (Araraquara, São Paulo, Brasil). Para a precipitação, centrífuga da FANEM (Guarulhos, São Paulo, Brasil) modelo Excelsa Baby II 206-BL e para quantificação, equipamento de HPLC-FLD constituído de um sistema de bombeamento quartenário modelo Waters 600E; injetor automático modelo Waters 717 e detector de fluorescência modelo Waters 474. A aquisição de dados foi realizada através do programa computacional Millenium<sup>32</sup> versão 4.0 (Waters, Milford, EUA).

## **Padrão e soluções**

### *Padrão*

Enrofloxacin (ENR), com pureza maior que 98%, obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e armazenada a temperatura de 10°C.

### *Solução estoque*

A solução de enrofloxacin (5 mg mL<sup>-1</sup>) foi preparada em solução aquosa 10% de ácido acético (v/v) e armazenada a -23°C em frasco de vidro âmbar por três meses.

Essa solução foi utilizada para a fortificação das amostras brancas de ração e construção das curvas analíticas.

### *Solução de extração*

Foi preparada uma solução aquosa 2% ácido fórmico (v/v), misturado com acetonitrila (ACN) na proporção 70:30 v/v e armazenado em frasco-reagente por período de, no máximo, 30 dias.

### *Solução para revestimento*

Com a dose estipulada para o ensaio farmacocinético de 10 mg kg<sup>-1</sup> p.v e fornecimento de ração para 1% da biomassa, foram preparadas bateladas de 100g de ração com 0.1% de ENR. É importante mencionar que no processo de revestimento há perdas do fármaco (REZENDE, 2012), sendo necessário realizar sua compensação. Assim, foram pesados num béquer 150mg de PVP – K30 e solubilizados com 21 mL de etanol. Em outro béquer, foram pesados 150mg da ENR e solubilizados em 9 mL de solução aquosa de ácido acético 0,5% (v/v). Essas duas soluções foram misturadas, perfazendo uma solução final com volume de 30mL. Esta solução foi vertida para um pulverizador manual.

## **Amostras**

As amostras comerciais de ração foram doadas pelo Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) de Jaboticabal – SP. Foi utilizada ração extrusada Pirá 28<sup>®</sup>, diâmetro de 4-6mm (Guabi, Campinas, São Paulo) adequada para a fase de crescimento em que os

peixes se encontravam. A composição da ração comercial utilizada está descrita na tabela 1. As amostras recebidas foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a temperatura de -19°C por período de seis meses.

A amostra referida como branco no estudo foi a amostra adicionada da solução de revestimento (PVP) sem a presença do analito (ENR).

Tabela 1. Composição da ração comercial Pirá 28<sup>®</sup> \*.

Composição	Concentração	Porcentagem (%)
Proteína bruta (mín.)	280 g Kg <sup>-1</sup>	28
Extrato etéreo (mín.)	50 g Kg <sup>-1</sup>	
Umidade (máx.)	80 g Kg <sup>-1</sup>	8
Matéria fibrosa (máx.)	70 g Kg <sup>-1</sup>	7
Matéria mineral (máx.)	100 g Kg <sup>-1</sup>	10
Cálcio (mín.)	12 g Kg <sup>-1</sup>	
Fósforo (mín.)	6 mg Kg <sup>-1</sup>	
Vitamina A (mín.)	16.000 UI Kg <sup>-1</sup>	
Vitamina D3 (mín.)	4.000 UI Kg <sup>-1</sup>	
Vitamina E (mín.)	200 UI Kg <sup>-1</sup>	
Vitamina B1 (mín.)	32 mg Kg <sup>-1</sup>	
Vitamina B2 (mín.)	32 mg Kg <sup>-1</sup>	
Vitamina B6 (mín.)	32 mg Kg <sup>-1</sup>	
Vitamina B12 (mín.)	32 µg Kg <sup>-1</sup>	
Vitamina C (mín.)	200 mg Kg <sup>-1</sup>	
Niacina (mín.)	150 mg Kg <sup>-1</sup>	
Biotina (mín.)	10 mg Kg <sup>-1</sup>	
Ácido fólico (mín.)	10 mg Kg <sup>-1</sup>	
Colina (mín.)	1.500 mg Kg <sup>-1</sup>	
Manganês (mín.)	50 mg Kg <sup>-1</sup>	5
Zinco (mín.)	150 mg Kg <sup>-1</sup>	15
Ferro (mín.)	150 mg Kg <sup>-1</sup>	
Cobre (mín.)	20 mg Kg <sup>-1</sup>	2
Cobalto (mín.)	0,5 mg Kg <sup>-1</sup>	
Iodo (mín.)	1 mg Kg <sup>-1</sup>	
Selênio (mín.)	0,7 mg Kg <sup>-1</sup>	

\*valores fornecidos pelo fabricante (Guabi).

## **Ração medicada**

### *Preparo da ração medicada*

O preparo foi baseado na técnica de revestimento de comprimidos por meio de irrigação ou aspersão da solução em drageadeira (ANSEL et al., 2000).

No misturador foram dispensados 100g de ração comercial, sendo pulverizados continuamente com a solução de revestimento.

Com o auxílio do secador de cabelos para volatilização do solvente e o misturador em rotação baixa, com inclinação próxima a 40°, toda a solução (30mL) foi pulverizada manualmente de forma constante sobre a ração comercial.

## **Método analítico**

### *Procedimento de preparo de amostra*

A técnica de preparo foi baseada no doseamento de comprimidos descritos nas Farmacopéias (USP, 2007 e BRASIL, 1988) e a proporção fase aquosa e orgânica na solução extratora de Galarini et al. (2009) .

### *Extração*

Aproximadamente 50 g de ração foram previamente triturados, homogeneizados em processador de alimentos e uma parcela de 1.0 g, pesada em tubo de polipropileno, tipo Falcon, com capacidade de 15 mL. A essa amostra foram adicionados 10 mL da solução de extração. Os tubos foram colocados em agitador mecânico com velocidade máxima por 1 minuto e centrifugados (1589 g) por 5 minutos. Uma alíquota de 2,5 mL do sobrenadante foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e completado o volume com água destilada. O extrato diluído foi filtrado com filtro PVDF 0,22µm e injetado no sistema cromatográfico. (Figura 1)

### *Separação, detecção e quantificação*

A separação dos analitos foi realizada em coluna analítica monolítica Chromolith® RP-18e (100 x 4.6mm – Merck, Darmstadt, Alemanha), mantida a temperatura de 22°C, fase móvel constituída por ácido fórmico 1%, acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH), com

eluição isocrática na proporção de 82:10:8 (v/v/v), volume de injeção de 10  $\mu$ L e vazão de 1mL/min. Tempo de corrida: 4 minutos. Detecção por fluorescência ( $\lambda_{exc}$  280 nm e  $\lambda_{em}$  450 nm / ganho de 1).

Curvas analíticas de resposta (altura do picos) *versus* concentração para a ENR foram construídas. As equações das curvas foram estimadas pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) e utilizadas para o cálculo das concentrações.

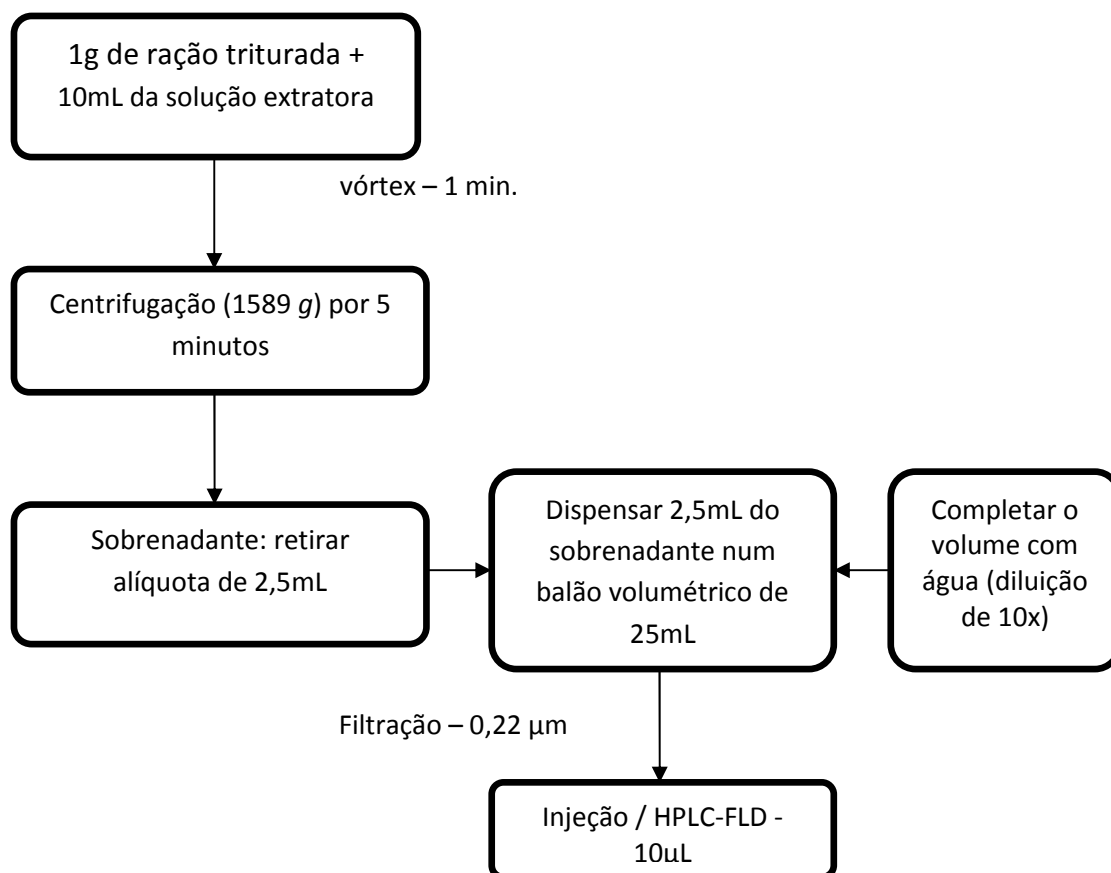


Figura 1. Fluxograma do método analítico desenvolvido para determinação de ENR na ração.

## **Validação do método analítico**

Para a validação intralaboratorial deste ensaio analítico foram seguidas recomendações do Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários do MAPA (BRASIL, 2011).

Foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, exatidão e precisão, limites de detecção e quantificação. Apesar das análises terem sido realizadas a partir de curvas matrizadas, o efeito matriz também foi avaliado.

### *Linearidade*

Curvas matrizadas através da adição do padrão realizada antes da extração foram preparadas em cinco níveis de concentração (2; 5; 10; 15 e 20  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e em três replicatas de cada nível. Alíquotas de 40, 100, 200, 300 e 400  $\mu\text{L}$ , respectivamente, da solução estoque foram utilizadas para o preparo das curvas.

Branco da curva foram preparados em triplicata e serviram de referência no controle de qualidade das análises e na avaliação do ruído, mas não foram incluídos nos cálculos.

A linearidade foi expressa através dos coeficientes angular (sensibilidade) e linear ( $r$ ) obtidos a partir de curvas analíticas matrizadas feitas em triplicata num mesmo dia e em três dias diferentes. Gráficos de resíduos foram gerados pela regressão linear e cálculos da estimativa dos parâmetros da regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários foram realizados.

### *Seletividade e efeito matriz*

A seletividade foi avaliada através da injeção de 10 amostras brancas independentes e comparada com amostras de matrizes fortificadas. O objetivo foi eliminar quaisquer dúvidas com possíveis coeluições de outros analitos próximos aos intervalos de tempo de retenção da ENR.

Outro estudo de seletividade importante realizado foi a avaliação do efeito matriz a fim de verificar possíveis interferências causadas por elementos diversos que compõem a matriz gerando fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal. O efeito matriz foi avaliado a partir de extratos purificados de amostras brancas de ração, fortificados em três



níveis de concentração (5, 10 e 15  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e comparados nessas mesmas concentrações com o analito no solvente.

#### *Exatidão, precisão e limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)*

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação, utilizando amostras de matrizes brancas fortificadas em três níveis de concentração (5, 10 e 15  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), todos em triplicata. Os resultados foram expressos como a porcentagem das concentrações média fortificadas na matriz em relação a concentração fortificada em solução padrão na mesma concentração.

Com relação à precisão, a mesma foi expressa por meio da repetitividade (precisão intradia) e da precisão intermediária (precisão interdias, reprodutibilidade interna ou intralaboratorial) através de seus coeficientes de variação (CV, %) em cada um dos níveis de fortificação estudados em triplicata.

A repetitividade foi realizada no mesmo dia, pelo mesmo analista e com os mesmos equipamentos.

Assim, da mesma maneira que foi feita a precisão intradia, também foi feita para a precisão intermediária, porém repetidos em três dias diferentes. Alíquotas de amostras brancas foram fortificadas com ENR nas concentrações de 5, 10 e 15  $\mu\text{g g}^{-1}$  e a média dos coeficientes de variação das concentrações obtidas de todos os dias foram usadas para expressar a precisão intermediária.

LOD e LOQ foram estimados pelo método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI, 2004). O valor obtido de LOQ por este método foi confirmado através da análise de 10 brancos de matrizes fortificadas, respeitando a relação sinal/ruído igual a 10 e aceitando-se exatidão entre 95 a 105% e precisão máxima de 3.5%, ou seja, abaixo de dois terços do valor de referência (5.3%) (BRASIL, 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Processo de revestimento da ração

No compêndio veterinário brasileiro, a ENR é apresentada nas seguintes formas farmacêuticas: solução injetável, pó solúvel para água de consumo e comprimidos nas dosagens de 15, 50 e 150mg (CPVS-SINDAN, 2013). Com a indisponibilidade de amostras de medicamentos para a produção das rações medicadas, a opção foi o uso do padrão analítico ( $\geq 98\%$ ) de ENR.

O desafio de conseguir uniformidade do antibiótico sobre a ração começou quando foi realizada a primeira tentativa de incorporar a mistura do padrão com óleo de soja – 2% (p/p). Observou-se visualmente que parte do que se incorporava se perdia por desprendimento do grânulo da ração durante o manuseio ou por aderência na parede da embalagem.

A segunda tentativa foi pulverizar a ração, torná-la pó, adicionar o medicamento e peletizá-la. Porém, considerando a situação real, em que o produtor precisa oferecer a ração medicada a um número muito superior de peixes e ao mesmo tempo ter um controle visual do seu consumo na administração, essa segunda tentativa foi deixada de lado. Assim surgiu a terceira tentativa; aplicar o que já existe de tecnologia na indústria farmacêutica para o revestimento da ração.

O uso de polímeros como propileno glicol (PG) e polietilenoglicol (PEG) em formulações de premixes destinados para uso na aquicultura já tem sido feito para resolução de problemas de aglomeração em formulações que utilizam altas porcentagens de óleo mineral e vegetal (SHAO, 2001). Outra aplicação de polímero visto na literatura é de LILLEHAUG (1989) e WONG et al. (1992) citados por SHAO (2001) que fizeram uso de Eudragit<sup>®</sup> (copolímero aniônico a base de ácido metacrílico e acrilato de etila) para revestimento entérico em formulações orais de vacinas contra vibrioses em peixes.

A aplicabilidade do PVP em dietas para peixe também é conhecida. Cantelmo et al. (2002) relataram que com o uso desse polímero como agente aglutinante na ração, há aumento no tempo de flutuação e uma considerável melhora na resistência física dos peletes. Conseqüentemente, menor lixiviação de nutrientes da ração para água.

Recentemente em nosso grupo de pesquisa, Rezende (2012), demonstrou que a técnica de revestimento com o uso de PVP-K30 para rações medicadas com ENR é de fácil realização e concluiu que as soluções de revestimento contendo 0,5 ou 2% deste polímero, reduzem a taxa de lixiviação do fármaco para água. Contudo, o tempo de flutuação e a temperatura, outras variáveis estudadas, foram estatisticamente significativos nos valores de lixiviação. Ou seja, quanto maior o tempo de flutuação e a temperatura do meio, maiores serão as taxas de lixiviação. Neste mesmo trabalho citado, a autora constata boa uniformidade no processo utilizado, com excelente distribuição da ENR sobre a ração.

No presente trabalho foi usado solução de PVP, na concentração de 0,5% e volume total para aspersão de 30 mL, o mesmo usado por Rezende (2012).

### **Preparo de amostra**

Na literatura, há muitos trabalhos que reportam diversos métodos analíticos para quantificação da ENR em diversas matrizes, porém em ração há uma carência de informações. Trabalhos publicados como de Galarini et al. (2009) e Sun et al. (2011), apresentam métodos com fins de fiscalização de possíveis resíduos provenientes de contaminação cruzada com fluoroquinolonas, dentre elas a ENR, em rações destinadas a peixes. Trabalhos com métodos analíticos para fins de controle de qualidade em rações animais não foram identificados com nenhuma fluoroquinolona.

O doseamento de princípios ativos em comprimidos se faz através da pulverização da amostra, seguida de extração sólido-líquido e diluição. Neste trabalho, seguiu-se o mesmo princípio e ao invés de comprimidos, foram utilizados grânulos de ração extrusada.

As fluoroquinolonas são compostos anfóteros. Elas podem se comportar como ácido ou como base. O que definirá seu comportamento será o pH do meio. Como característica físico-química, possuem boa solubilidade em solventes orgânicos polares e é muito comum o uso de misturas aquosas-orgânicas nos métodos de extração em que as envolvem.

Para definir a composição da solução extratora, foram testadas: (i) solução aquosa de ácido fórmico e (ii) solução aquosa de ácido acético, ambas na mesma concentração (2%) misturadas à ACN, na proporção 70:30 (v/v). Verificou-se que com o ácido acético, a eficiência de extração foi 5% menor em relação ao outro ácido. Assim, mesmo diante de pouca diferença, foi feita a opção pelo ácido fórmico.

O trabalho de Galarini et al. (2009) traz a proporção de 70:30 – fase aquosa : fase (v/v) para a extração de onze quinolonas em ração animal, com o uso de ácido metafosfórico e ACN . Essa proporção foi a mesma utilizada neste trabalho. Porém, ainda com relação ao trabalho citado, não foi necessária a limpeza com cartuchos de extração em fase sólida e repetição da extração, devido aos valores obtidos de recuperação serem adequados (96-102%).

### Validação do método analítico

A seletividade do método, primeiro parâmetro avaliado, foi confirmada com a ausência de picos interferentes no intervalo de retenção da ENR na análise de 10 brancos da amostra (Figura 3.).

Não foi observado efeito matriz em nenhum dos níveis de fortificação (Figura 2).

Curvas analíticas foram construídas a partir de brancos de ração comercial fortificadas nos níveis de concentração 2, 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{g g}^{-1}$  e os valores obtidos apresentaram forte correlação linear, acima de 0.999 (Figura 4 e Tabela 2.).

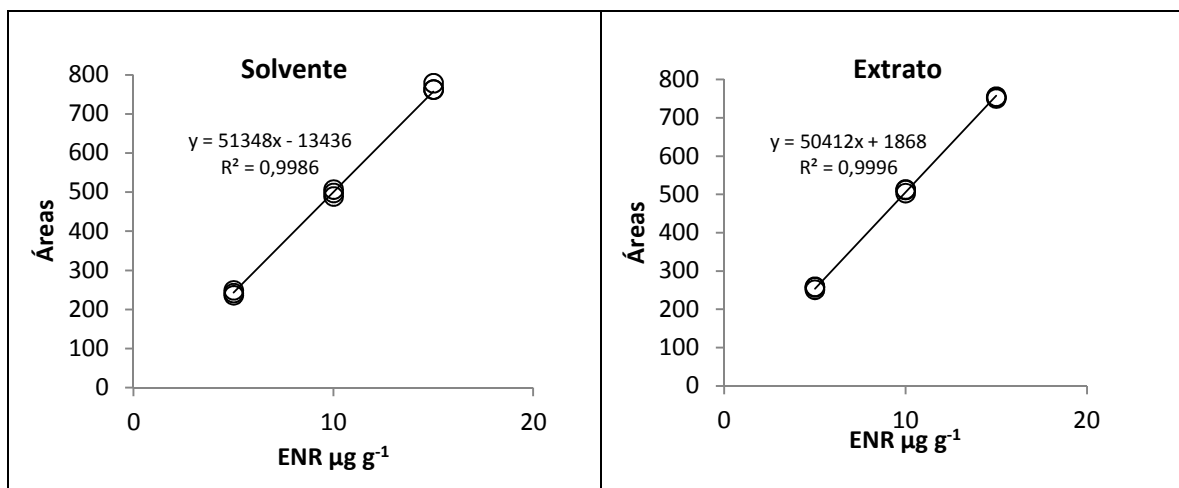


Figura 2. Curvas analíticas no solvente e no extrato fortificado para a ENR na ração e a ausência de efeito matriz.

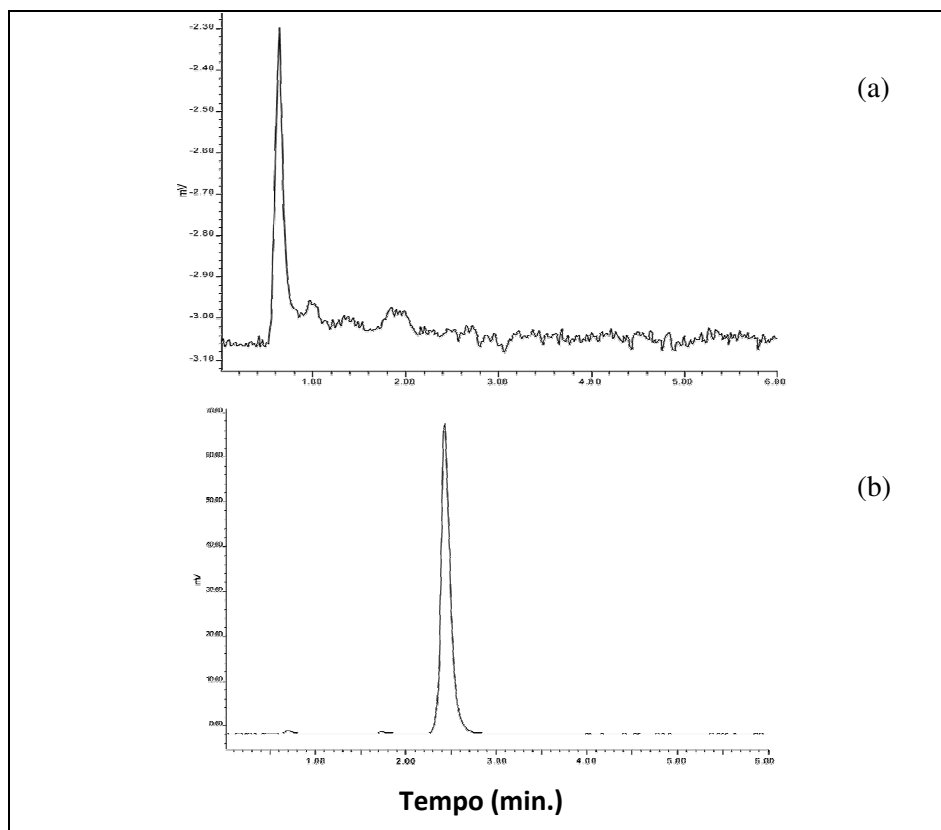


Figura 3. Amostra branca (a) e matriz fortificada com ENR (b)  $10\mu\text{g g}^{-1}$  na ração

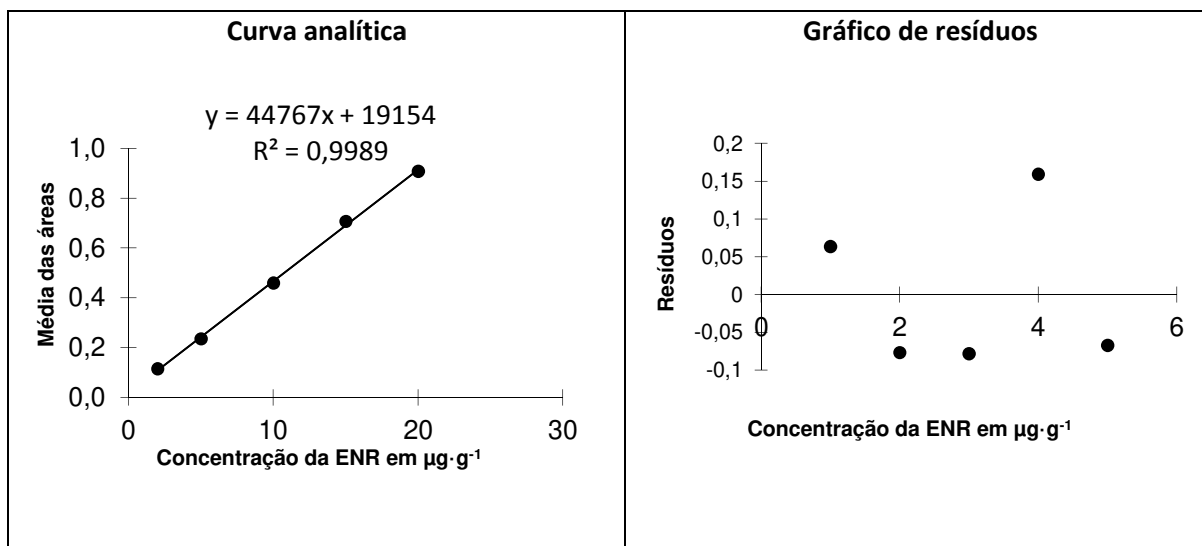


Figura 4. Curva analítica para a determinação da ENR na ração e gráfico de resíduos da regressão.

Valores de LOD e LOQ com precisão e exatidão aceitáveis estão apresentados na tabela 2, assim como outros parâmetros obtidos na validação.

Os resultados obtidos de exatidão e precisão do método estão de acordo com os valores preconizados pelo MAPA (BRASIL, 2011). Assim os valores médios de exatidão estiveram entre 98 e 100%. Quanto à precisão intradia, a mesma foi obtida a partir de triplicatas ( $n = 3$ ) com as amostras processadas e analisadas num mesmo dia. O processo foi repetido em três dias diferentes e esta foi expressa como a média dos coeficientes de variação (CV, %) obtidos para as triplicatas das análises realizadas em cada um dos dias. A precisão interdias foi obtida a partir das mesmas análises realizadas com as amostras fortificadas para a obtenção da precisão intradia. No entanto, o resultado foi expresso como o CV (%) das médias calculadas a partir das triplicatas analisadas em cada um dos dias (Tabela 2).

Os valores de CVs ficaram abaixo de dois terços do valor mínimo de referência (3.7%) admitindo C o maior nível de concentração expresso em  $2 \text{ mg g}^{-1}$

Tabela 2. Valores dos parâmetros de validação do método por LC-FLD para determinação de enrofloxacina (ENR) na ração medicada.

<b>PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO</b>	
<b>Faixa de trabalho (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	2-20
<b>Linearidade (<math>r^2</math>)</b>	0,9994
<b>Sensibilidade (ua <math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	45639
<b>LOD (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	0,7
<b>LOQ (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	2
<b>Precisão Intradia (CV %)</b>	
5 $\mu\text{g g}^{-1}$	0,92
10 $\mu\text{g g}^{-1}$	0,77
15 $\mu\text{g g}^{-1}$	1,72
<b>Precisão Interdia (CV %)</b>	
5 $\mu\text{g g}^{-1}$	1,03
10 $\mu\text{g g}^{-1}$	0,90
15 $\mu\text{g g}^{-1}$	1,76
<b>Exatidão (% Recuperação)</b>	
5 $\mu\text{g g}^{-1}$	96 - 99
10 $\mu\text{g g}^{-1}$	98 - 101
15 $\mu\text{g g}^{-1}$	99 - 102

### **Análise da ração medicada**

Com o método validado para a quantificação da ENR na ração, o mesmo foi aplicado nas rações preparadas laboratorialmente.

Como foram feitas três bateladas de 100g, totalizando 300g, as rações de cada batelada foram misturadas entre si e realizada a amostragem por quarteamento manual. Feito isso, foram analisadas em triplicata da maneira já descrita anteriormente.

O resultado obtido na amostra analisada apresentou precisão satisfatória (CV=2.76%), ou seja, abaixo de dois terços do valor do coeficiente admitido (5.3%) para o nível da concentração esperado (1.0 mg g<sup>-1</sup>). O teor da ENR (1.047 mg g<sup>-1</sup>) quantificado ficou muito próximo do esperado.

## CONCLUSÕES

Para determinação da ENR na ração, o método desenvolvido e validado empregando cromatografia líquida com detecção por fluorescência foi adequado para a quantificação do analito.

É importante citar que foi utilizado o padrão analítico da ENR ( $\geq 98\%$ ) e não o medicamento. Isto significa dizer que essa técnica proporcionou de maneira eficiente a incorporação dessa quantidade de fármaco na ração. Além disso, manter as características iniciais de composição e estrutura da ração alia só vantagens a esse método de preparo.

Por fim, ainda sobre o processo de revestimento da ração, mais estudos devem ser realizados tais como, estabilidade do fármaco na ração revestida, palatabilidade, permanência do fármaco ligado nos ambientes aquáticos e alteração na cinética do fármaco nos animais em estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSEL, H. C; POPOVICH, N. G; ALLEN Jr. L. V. **FARMACOTÉCNICA: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo, 2000. 568p.

BRASIL, 1988. **Farmacopéia Brasileira**. 4ªed. São Paulo, 1988.

BRASIL, 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 72p.

BRASIL, 2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 11 de 22 de maio de 2012**. Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2012. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/IN%2011-%202012.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/IN%2011-%202012.pdf)>. Acesso em: 05 mai. 2013.

BRASIL, 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lista de Produtos com Licença Vigente. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Registros\\_Autorizacao/listas%20de%20produtos/RELVIG\\_042013.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Registros_Autorizacao/listas%20de%20produtos/RELVIG_042013.pdf)> Acesso em: 02 mai. 2013.

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.



CPVS-SINDAN. Compêndio de Produtos Veterinários. Disponível em: <<http://www.cpvs.com.br/cpvs/index.html>> Acesso em: fev. 2013.

DANYI, S.; WIDART, J.; DOUNY, C.; DANG, P. K.; BAIWIR, D.; WANG, N; TU, H. T.; TUNG, V. T.; PHUONH, N. T.; KESTEMONT, P.; SCIPPO, M. L. Determination and kinetic of enrofloxacin and ciprofloxacin in Tra catfish and giant freshwater prawn using a liquid chromatography/mass spectrometry method. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 34, p. 142-152, 2010.

FAO/OIE/WHO , 2006. Report of a joint FAO/OIE/WHO. Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance. Seoul, República da Coréia do Sul, 13- 16 jun. 2006.

GALARINI, R; FIORONI, L; ANGELUCCI, F.; TOVO, G. R; CRISTOFANI, E. Simultaneous determination of eleven quinolones in animal feed by liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8158-8164, 2009.

LILLEHAUG, A. Oral immunization of rainbow trout, *salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis with vaccines protected against digestive degradation. **Journal Fish Disease**.12,p. 579-584, 1989.

MARTINEZ, M.; DERMOTT, P.; WALKER, R. Pharmacology of fluorquinolones: A perspective for the use in domestic animals. **The Veterinary Journal**. v. 172, p. 10-28, 2006.

PHIBRO Animal Health Corporation. TM<sup>®</sup> 700 – Ficha Técnica. Disponível em : <[http://www.phibro.com.br/ft/TM\\_700.FT.pdf](http://www.phibro.com.br/ft/TM_700.FT.pdf)>. Acesso em: 02 mai. 2013.

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

RIBANI, M; BOTTOLI, C. B. G; COLLINS, C. H; JARDIM, I. C. S. F; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004

ROWE, R. C; SHESKEY, P. J; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. London-Chicago, 2009. 581p.

SAMUELSEN, O. B. Pharmacokinetics of quinolones in fish: a review. **Aquaculture**. v. 255, p. 55-75, 2006.

- SERRANO, P. H. Responsible use of antibiotics in aquaculture. **Fisheries Technical Paper 469**. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, 2005.
- SHAO, Z. J. Aquaculture pharmaceuticals and biological: current perspectives and future possibilities. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.50, p. 229-243, 2001.
- SHERING-Plough – Animal Health. Boletim Técnico Aquaflor®. Disponível em: <<http://www.aquatropic.com.br/images/Boletim%20T%C3%A9cnico%20Aquaflor.pdf>> . Acesso em: 05 jan. 2013.
- SUN, H; WANG, L; QIN, X; GE, X. Simultaneous determination of malachite green, enrofloxacin and ciprofloxacin in fish farming water and fish feed by liquid chromatography with solid-phase extraction. **Environmental Monitoring Assessment**. 179, p. 421-429, 2011.
- USP30 – NF25. **United States Pharmacopeia**. versão em CD: Rockville, 2007.
- WONG, G.; KAATTARI, S. L; CHRISTENSEN, J. M. Effectiveness of an oral enteric coated vibrio vaccine for use in salmonid fish. *Immunological Investigations*.v. 21, p. 353-364, 1992.

## CAPÍTULO III

### **Estudo farmacocinético da enrofloxacinina em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) após administração oral em dose única**

Este capítulo será submetido para publicação na *Aquaculture*



## **Estudo farmacocinético da enrofloxacina em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) após administração oral em dose única**

### **RESUMO**

A disposição cinética da enrofloxacina (ENR) no plasma e a distribuição nos tecido muscular foram avaliados em tilápias-do-Nilo após única administração oral (10 mg kg<sup>-1</sup> p.v) através de ração medicada. Os peixes foram mantidos em temperatura entre 28 e 30°C. Os tempos de coleta foram fixados de meia hora até 5 dias após a administração. As amostras foram analisadas por HPLC-FLD. A ENR foi lentamente absorvida e eliminada do plasma ( $C_{\max} = 1.241 \pm 0.376 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $T_{\max} = 8 \text{ h}$ ;  $T_{1/2Ke} = 19.36\text{h}$ ). A ENR distribuiu-se de forma eficiente, mantendo-se em concentrações altas no tecido muscular ( $2.166 \pm 0.742 \mu\text{g g}^{-1}$ ). O seu metabólito, a ciprofloxacina (CIP), foi detectado no plasma e no músculo, porém em baixíssimas concentrações. Após administração oral, a concentração média no plasma e tecidos foi bem superior às concentrações inibitórias mínimas (CIM) para a maioria das bactérias já isoladas de peixe. Utilizando essa dosagem pode-se dizer que é possível obter concentrações terapêuticas no sangue.

Palavras-chave: farmacocinética; peixe; plasma; músculo; antibiótico.

## Pharmacokinetic study of enrofloxacin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after single oral administration

### ABSTRACT

The plasma kinetics and tissue distribution of enrofloxacin (ENR) were investigated in Nile tilapia after single oral administration by medicated feed (10 mg kg<sup>-1</sup> p.v.) kept in freshwater at 28 – 30°C. Plasma and tissue concentration of ENR and of its metabolite ciprofloxacin (CIP) were determined by HPLC-FLD from 0,5 to 120h. ENR was slowly absorbed and eliminated ( $C_{\max} = 1.241 \pm 0.376 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $T_{\max} = 8 \text{ h}$ ;  $T_{1/2Ke} = 19.36\text{h}$ ). ENR was distributed efficiently to the extravascular compartment, with high concentrations ( $2.166 \pm 0.742 \mu\text{g g}^{-1}$ ). CIP was detected in plasma and tissue, however in low concentrations. After oral administration, the mean plasma and tissue concentrations was well above the minimum inhibitory concentrations (MIC). It is possible to obtain therapeutic blood concentrations of enrofloxacin in Nile tilapia using this oral administration. Therefore; it may be effective in the therapy for Nile tilapia.

Keywords: pharmacokinetic; enrofloxacin; fish; plasma; muscle; antibiotic.

## INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA (BRASIL, 2012), em 2010, como em outros anos anteriores, a tilápia (155.450,8t.) seguida da carpa (94.579t.) foram as espécies mais cultivadas na aquicultura continental brasileira. Somadas representaram 63,4% da produção nacional de pescado nesta modalidade.

A alta estocagem nos tanques, o excesso de matéria orgânica proveniente das sobras de ração e outros erros no manejo, tornam esses animais muito susceptíveis às diversas doenças de origem bacteriana.

A escolha de um agente terapêutico para o tratamento de bacterioses na aquicultura é uma tarefa difícil de realizar adequadamente. O ideal é que a escolha do agente seja feita por um especialista em saúde de peixe e que o medicamento seja licenciado para uso. No entanto, na maioria das vezes não há um profissional com tal conhecimento e em muitos países há uma completa ausência de agentes licenciados. Até mesmo nos países onde há medicamentos licenciados, o número costuma ser tão pequeno que a escolha se torna bastante limitada, agravando problemas de resistência aos antimicrobianos já existentes (GUARDABASSI et al., 2008).

No Brasil ocorre exatamente o que foi descrito: apenas há dois agentes para escolha - florfenicol e oxitetraciclina, pouquíssimos profissionais qualificados e carência de informações de campo sobre a eficácia clínica dos antimicrobianos nas diversas espécies cultivadas aqui. Como consequência, o uso de medicamentos legislados para outras espécies animais sendo aplicado em peixes tem se tornado uma prática comum.

Enrofloxacin (ENR) é um desses agentes não licenciados na aquicultura. Com exceção dos países asiáticos; China e Tailândia onde seu uso é permitido (FANG et al., 2011; UDOMKUSONSRI et al., 2007), em nenhum outro país seu uso é regulamentado para a aquicultura. Porém, é muito usada no tratamento de processos de septicemia generalizado e infecções externas em peixes (SAMANIDOU et al., 2008).

Até 2005, seu uso nos Estados Unidos em animais produtores de alimentos era permitido para aves, bovinos e suínos. Com as evidências do desenvolvimento de resistência da *Campylobacter jejuni* à ENR em frangos de corte, o fármaco foi proibido

para aves (FDA, 2012) e atualmente, é proibido seu uso *extra-label* sendo apenas permitido para bovinos e suínos (FDA, 2013).

No Brasil, assim como nos Estados Unidos, o uso de ENR é permitido em bovinos, suínos, caprinos, ovinos e aves de corte. No entanto, em 2010, o MAPA através do PNCRC/Animal, a incluiu na lista dos antimicrobianos a serem monitorados em peixes de cultivo.

Por ser uma fluoroquinolona, é considerada um fármaco bactericida, de amplo espectro que possui efeito pós-antibiótico para a maioria de patógenos gram-negativos. Ocasionalmente causa morte bacteriana concentração-dependente e é especialmente indicada para diversas infecções entéricas, respiratórias, urinária, daqueles do complexo mastite, metrite e agalaxia, dentre outros (LODE et al., 1991).

De uma maneira mais ou menos extensiva, a ENR é convertida em ciprofloxacina (CIP) por desalquilação no fígado. Isso ocorre em mamíferos e não mamíferos. A atividade antimicrobiana da CIP contribui para a atividade da ENR (USP, 2003). Além disso, a ENR possui liberação lenta a partir do tecido, apresentando tempos de meia-vida relativamente longos o que assegura o prolongamento do intervalo entre as doses. Isto permite a administração de uma dose única diária (BUFFÉ et al., 2001). No entanto pelo tempo de meia-vida ser longo, a ampla utilização das quinolonas em peixes destinados ao consumo humano é um problema sério, pois seus resíduos podem persistir em tecidos animais comestíveis por um tempo considerável, caso não sejam obedecidos o tratamento e o tempo de carência recomendados (LUCCHETTI et al., 2004)

Propriedades farmacocinéticas da enrofloxacinina em peixes já foram estudadas por diversos autores em diversos peixes, na maioria deles provenientes da Europa como em truta arco-íris (BOWSER et al., 1992), salmão do Atlântico (MARTINSEN & HORSBERG, 1995; STOFFREGEN et al., 1997), pacu vermelho (LEWBART et al., 1997), dourado (DELLA ROCCA et al., 2004), bagre coreano (KIM et al., 2006), robalo (INTORRE et al., 2000), truta marrom (KOC et al., 2009) e carpa prateada (FANG et al., 2011).

Dentro deste contexto, com a falta de dados farmacocinéticos da ENR em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e suspeita do seu uso na piscicultura brasileira, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar métodos analíticos em LC-FLD nas matrizes



plasma e músculo de tilápias e obter o perfil farmacocinético da ENR após única administração oral (10 mg kg<sup>-1</sup> p.v.) através de ração medicada.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Reagentes e materiais**

Acetonitrila (ACN) grau HPLC da J.T. Baker (Philipsburg, EUA), metanol (MeOH) da Honeywell Burdick & Jackson (Muskegon, EUA). Ácido fórmico, grau analítico, foi adquirido da Acros Organics (New Jersey, EUA). Ácido acético glacial da Qhemis (São Paulo, Brasil) e hexano da Carlo Erba (Rodano, Itália). Durante este estudo, utilizou-se água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). As fases móveis foram filtradas utilizando membranas com uma porosidade de 0,22 µm de fluoreto de polivinilideno (PVDF) e politetrafluoretileno (PTFE) (Millipore, EUA). Os extratos finais foram filtrados em filtros de PVDF de 0,22 µm (Millipore, EUA).

### **Equipamentos**

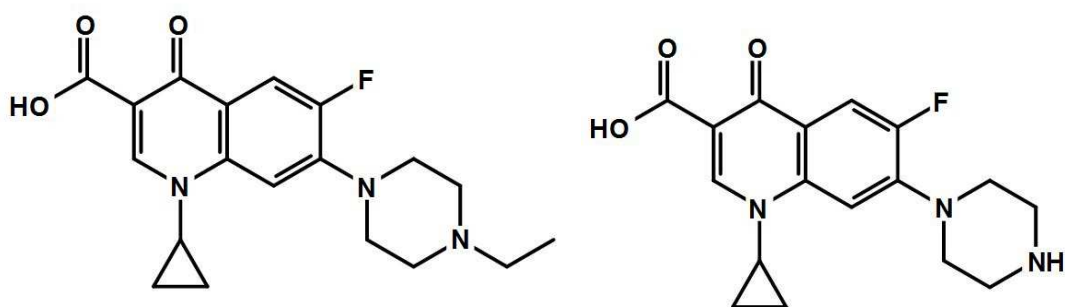
Alíquotas de plasma foram coletadas e dispensadas com pipetas monocanal automáticas, modelo Research<sup>®</sup> da Eppendorf (Hamburg, Alemanha). No preparo das amostras foram utilizados agitador de tubos - vórtex, marca Phoenix Lufenco, modelo AP-56 (Araraquara, São Paulo, Brasil), centrífuga da FANEM (Guarulhos, São Paulo, Brasil) modelo Excelsa Baby II 206-BL e evaporador centrífugo CentriVap<sup>®</sup> da Labconco (Kansas City, EUA).

Para o preparo das amostras de músculo, foi utilizada balança analítica, modelo BL 2105 (Sartorius, Alemanha) para pesagem. A trituração e homogeneização das amostras de músculo foram feitas em processador de alimentos, modelo 600W da Philips Walita (Barueri, São Paulo Brasil), agitador de tubos - vórtex, marca Phoenix Lufenco, modelo AP-56 (Araraquara, São Paulo, Brasil) e banho ultrassônico, modelo 08895-10 (Cole-Parmer, México). Além desses, também foram utilizados centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5810R (Hamburg, Alemanha) e evaporador rotativo modelo MA 120 (Marconi, Brasil).

## Padrões e soluções

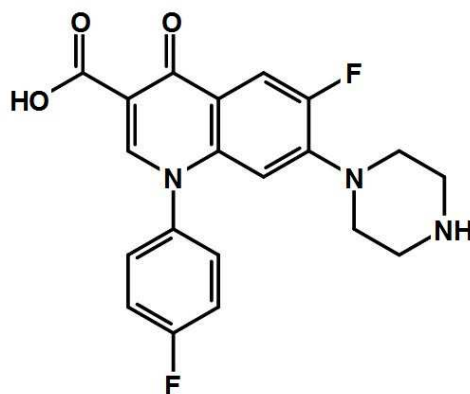
### Padrões

Os padrões de ENR e CIP (pureza  $\geq 98\%$ ) e sarafloxacina - SAR ( $\geq 97\%$ ) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e armazenados na temperatura de  $10^{\circ}\text{C}$ . (Figura 1).



Enrofloxacin (ENR)

Ciprofloxacin (CIP)



Sarafloxacin (SAR)

Figura 1. Estrutura molecular das fluoroquinolonas.

### *Soluções estoque*

As soluções de CIP, ENR e SAR (1 mg/mL) foram preparadas individualmente em balões volumétricos de 25 mL pela dissolução do padrão em solução aquosa 10% de ácido acético. As soluções foram armazenadas a -23°C em frascos de vidro âmbar e preparadas trimestralmente.

### *Soluções de trabalho (pool)*

Foram preparadas quatro soluções para construção da curva analítica a partir de 1mL da solução estoque das fluoroquinolonas ENR e CIP. Foram realizada sucessivas diluições com água destilada em balões volumétricos de 10 mL.

### *Solução do padrão interno*

A solução de trabalho do padrão interno (SAR) foi preparada a partir de 1 mL da solução estoque e feitas sucessivas diluições apropriadas com água em balões volumétricos de 10 mL.

### **Amostras**

As referências de branco de plasma e de músculo de tilápia foram doadas pelo Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP). Todas estavam livres da presença de ENR e CIP.

### **Método analítico**

A quantificação dos analitos no plasma e no músculo foi realizada em um equipamento de HPLC-FLD constituído de um sistema de bombeamento quartenário modelo Waters 600E; injetor automático modelo Waters 717 e detector de fluorescência modelo Waters 474. A aquisição de dados foi realizada através do programa computacional Millennium<sup>32</sup> versão 4.0 (Waters, Milford, EUA). .

**Plasma.** O método de ensaio executado foi fundamentado no método reportado por Mohan et al. (2006, citado por KOC et al., 2009) com algumas modificações que serão descritas mais adiante.

O princípio do método é baseado na precipitação das proteínas existentes no plasma com o uso de acetonitrila (ACN).

#### *Extração e limpeza*

Após o descongelamento em temperatura ambiente e homogeneização, uma alíquota de 500µL de plasma foi pipetada em tubo de polipropileno, tipo Falcon, com capacidade de 15 mL e adicionado de 1 mL de ACN. O tubo foi colocado em agitador mecânico ajustado em velocidade máxima por um período de 30 segundos. Os extratos homogeneizados foram centrifugados (1589 g) por 5 minutos. Para completa limpeza do extrato e não mais precipitação de proteínas, mais 2 mL de ACN foram adicionados ao sobrenadante e repetidos os mesmos processos de agitação e centrifugação das mesmas condições anteriores já citadas.

O extrato foi evaporado a 50°C em evaporador centrífugo e ressuspenso em 500µL de água destilada (Figura 2).

#### *Separação, detecção e quantificação*

A separação dos analitos foi realizada em coluna analítica monolítica Chromolith® RP-18e (100 x 4.6mm – Merck, Darmstadt, Alemanha), mantida a temperatura de 22°C, fase móvel constituída por ácido fórmico 1%, acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH). Eluição isocrática na proporção de 82:10:8 (v/v/v), volume de injeção de 10µL e vazão de 1mL/min, tempo total de corrida de 4 minutos. Detecção por fluorescência ( $\lambda_{exc}$  280 nm e  $\lambda_{em}$  450 nm / ganho de 1000).

Curvas analíticas (altura dos picos) *versus* concentração de cada fluoroquinolona foram construídas. As equações das curvas foram estimadas pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) e utilizadas para o cálculo das concentrações.

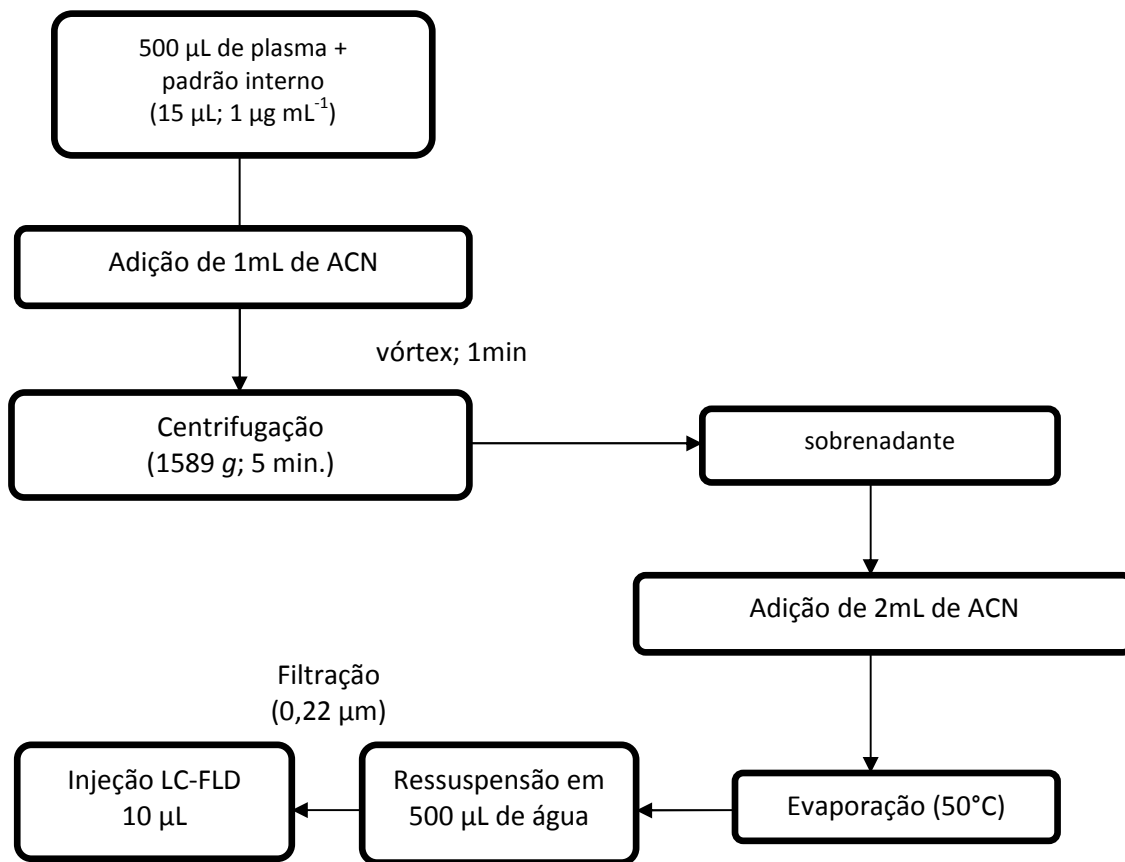


Figura 2. Fluxograma do método analítico desenvolvido para determinação de CIP e ENR no plasma.

**Músculo.** O método de ensaio executado baseou-se em McMullen et al. (2009) com apenas algumas modificações descritas a seguir.

#### *Extração e Limpeza*

Após o descongelamento em temperatura ambiente, foi pesado um  $1.0 \pm 0.05$ g de músculo sem pele em tubo de polipropileno (tipo Falcon) com capacidade de 50 mL. A este foram adicionados 5 mL de uma solução de ACN com 1% de ácido acético (v/v). Os tubos foram colocados em agitador mecânico em velocidade máxima por um período de 1 minuto. Após homogeneização, os extratos permaneceram em banho ultrassônico por 5 minutos e então centrifugados (10,000 g) por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrífuga tipo Falcon de mesma capacidade. O precipitado foi ressuspenso com mais 5 mL da solução de ACN 1% de ácido acético (v/v), agitado e

centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente. Os sobrenadantes foram agrupados e 5 mL de hexano foram adicionados para limpeza do extrato. Os tubos foram colocados novamente em agitador mecânico, porém em baixa velocidade por 30 segundos. Após agitação, permaneceram em descanso por cerca de 5 minutos e por fim, a fração superior (hexano) succionada a vácuo. Os extratos foram levados a total secura através de evaporador rotativo com banho a 50°C e ressuspensos com 1 mL de água destilada (Figura 3).

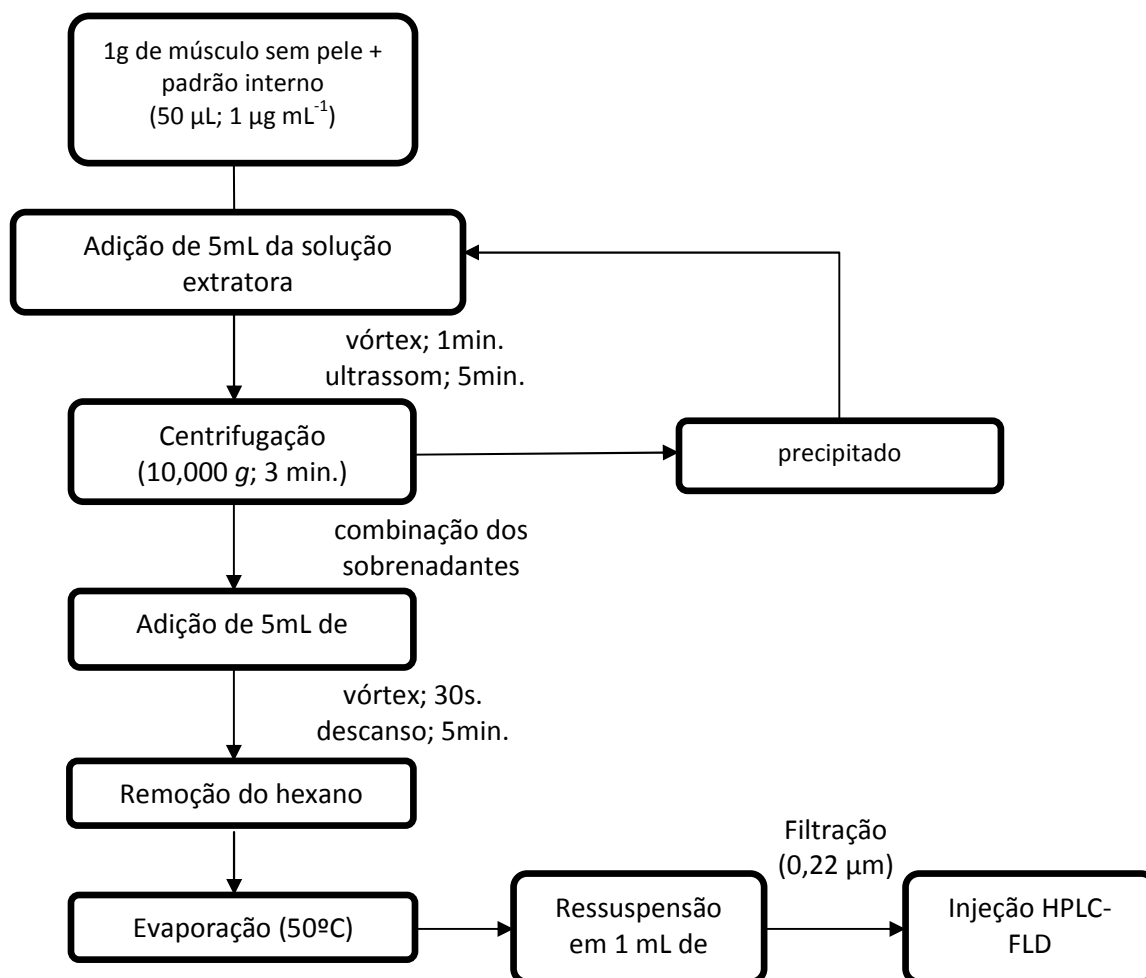


Figura 3 . Fluxograma do método analítico desenvolvido para determinação de CIP e ENR no músculo.

### *Separação, detecção e quantificação*

A separação dos analitos foi realizada em coluna analítica monolítica Chromolith® RP-18e (100 x 4.6 mm – Merck, Darmstadt, Alemanha), mantida a temperatura de 22°C, fase móvel constituída por ácido fórmico 1%, acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH). Eluição isocrática na proporção de 85:10:5 (v/v/v), volume de injeção de 10µL e vazão de 1mL/min, tempo total de corrida de 6 minutos. Detecção por fluorescência ( $\lambda_{exc}$  280 nm e  $\lambda_{em}$  450 nm / ganho de 1000).

Curvas analíticas (altura dos picos) *versus* concentração de cada fluoroquinolona foram construídas. As equações das curvas foram estimadas pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) e utilizadas para o cálculo das concentrações.

### **Validação dos métodos analíticos**

Para a validação intralaboratorial dos ensaios analíticos, seguiu-se recomendações dos guias da FDA (FDA, 2001) e ANVISA (BRASIL, 2003) para matriz plasma e MAPA (BRASIL, 2011) para matriz músculo. Em ambos foi utilizado a SAR para padronização interna.

Foram avaliados e estabelecidos parâmetros de linearidade, seletividade, efeito matriz, exatidão, precisão, limite de detecção e quantificação, a partir de soluções padrão, amostras brancas e amostras fortificadas.

#### *Linearidade*

Foram preparadas curvas matrizadas através da adição do padrão realizada antes da extração, em cinco níveis de concentração e em três replicatas de cada nível: (i) *plasma*: 5, 10, 30, 50 e 100 ng mL<sup>-1</sup> e (ii) *músculo*: 10, 30, 50, 100 e 150 ng g<sup>-1</sup>. Uma quantidade fixa de padrão interno (SAR) foi adicionada em todas as amostras.

Branco da curva foram preparados, em triplicata, e serviram de referência no controle de qualidade das análises e na avaliação do ruído, mas não foram incluídos nos cálculos.

A linearidade foi expressa através dos coeficientes angular (sensibilidade) e linear (r) obtidos a partir de curvas analíticas matrizadas feitas em triplicata num mesmo dia e em três dias diferentes. Gráficos de resíduos foram gerados pela regressão linear e cálculos da

estimativa dos parâmetros da regressão, pelo método dos mínimos quadrados ordinários foram realizados.

#### *Seletividade e efeito matriz*

A seletividade foi avaliada através de 20 injeções de amostras brancas e comparadas com amostras de matrizes fortificadas no LOQ. O objetivo foi eliminar quaisquer dúvidas com possíveis coeluições de outros analitos próximos aos intervalos de tempo de retenção da ENR e CIP, como também do padrão interno (SAR).

Outro estudo de seletividade, o efeito matriz, foi realizado a fim de verificar possíveis interferências causadas por elementos diversos que compõem a matriz gerando fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal.

Para a determinação do efeito matriz, foram feitas curvas analíticas dos analitos puros no solvente de ressuspensão (água destilada) e curvas analíticas a partir de extratos purificados de amostras brancas de plasma e músculo de tilápias, fortificados com a solução *pool* e comparadas nos cinco níveis de concentração.

#### *Exatidão, precisão e limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)*

A exatidão dos métodos (plasma e músculo) foi avaliada através de ensaios de recuperação, utilizando amostras de matrizes brancas fortificadas com cada um dos analitos nos cinco níveis de concentração, todos em triplicata. Os resultados foram expressos como a porcentagem das concentrações média fortificadas na matriz em relação a concentração fortificada em solução padrão na mesma concentração.

Com relação à precisão, a mesma foi expressa por meio da repetitividade (precisão intradia) e da precisão interdias (ou reprodutibilidade interna ou intralaboratorial) através de seus coeficientes de variação (CV, %) em cada um dos níveis de fortificação estudados em triplicata.

A repetitividade foi realizada no mesmo dia, pelo mesmo analista e com os mesmos equipamentos, enquanto que para a precisão intermediária, as análises foram realizadas pelo mesmo analista, pelos mesmos equipamentos, porém repetidos em três dias diferentes. Alíquotas de amostras brancas foram fortificadas com ENR e CIP em cinco concentrações



e a média dos coeficientes de variação das concentrações obtidas de todos os dias foi usada para expressar a precisão intermediária.

LOD e LOQ foram estimados pelo método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI, 2004). O valor obtido de LOQ por este método foi confirmado através da análise de 20 brancos de matrizes fortificadas, repetindo a relação sinal/ruído igual a 10 e aceitando-se precisão de até 20% e exatidão entre 80 a 110% para plasma e músculo.

### **Estudo de estabilidade**

Foram realizados dois estudos de estabilidade seguindo recomendações da Diretiva 2002/657/ EC (2002) e do Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos (FDA, 2001): (i) estudo de estabilidade dos analitos CIP, ENR e SAR em solução e (ii) dos analitos (CIP e ENR) no plasma (matriz).

***Analitos em solução.*** Soluções de CIP, ENR e SAR ( $1\text{mg mL}^{-1}$ ) foram preparadas de acordo com o método de preparo das soluções estoque e cada uma dividida em 27 alíquotas de 3mL cada. Elas foram analisadas em triplicata imediatamente após o preparo, 6 horas depois mantidas em temperatura ambiente com iluminação fluorescente e nos intervalos de 7, 14, 21, 28, 45, 60 e 90 dias.

Os resultados foram obtidos a partir da comparação das concentrações das soluções recém-preparadas (solução do dia) com as de estudo.

***Analitos no plasma.*** Para o estudo de estabilidade da ENR e CIP na matriz, foram preparadas três alíquotas de 2 mL para cada intervalo de tempo e fortificadas em microtubos de polipropileno em três níveis de concentração ( $30\text{ng mL}^{-1}$ ;  $100\text{ng mL}^{-1}$  e  $1000\text{ng mL}^{-1}$ ) e armazenadas a  $-23^{\circ}\text{C}$ . A concentração dos analitos foi determinada em triplicata após 7, 14, 30, 60 e 90 dias, período máximo em que as amostras permaneceriam congeladas aguardando por análise.

No dia da análise, as amostras congeladas foram descongeladas à temperatura ambiente e analisadas conforme método analítico estabelecido e validado para plasma.

Os resultados foram obtidos a partir da comparação das concentrações das amostras armazenadas no congelador com as amostras preparadas no primeiro dia, nos mesmos níveis de fortificação.

### **Ensaio farmacocinético**

O ensaio foi realizado no Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) em Jaboticabal (São Paulo, Brasil) nas dependências do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESP – protocolo nº 016078/11.

Para o estudo foram utilizadas 144 tilápias-do-Nilo ( linhagem GIFT) classificadas de acordo com o peso em: pequenas (100-170g), médias (170-230g) e grandes (230-300g). Elas foram alocadas em 12 caixas de fibra de vidro (n = 12 peixes/caixa) com capacidade de 310L cada.

As caixas foram abastecidas através de sistema de recirculação, filtração de água e oxigenadas por aeradores acoplados à pedra porosa. A temperatura da água variou entre 28 a 30°C, 4 - 6ppm de oxigênio e pH médio de 7.5 e condutividade de 0.196 a 0.221  $\mu.S\ cm^{-1}$ . Durante o experimento houve óbito de 4 animais.

Os peixes foram aclimatados nas caixas experimentais por 15 dias antes do ensaio e alimentados diariamente, duas vezes ao dia (1% da biomassa), com ração comercial extrusada livre do antibiótico (Pirá 28<sup>®</sup> Guabi, Brasil). No dia que antecedeu o ensaio os peixes não receberam ração.

No dia do experimento sete das 12 caixas receberam ração medicada e o restante serviu como amostras-testemunha. A dose de antibiótico na ração administrada foi de 10 mg kg<sup>-1</sup> (1% da biomassa). A dose foi baseada na concentração recomendada de ENR para espécies com menor porte (EMEA, 2011).

A formulação da ração foi feita através da incorporação da ENR ( $\geq 98\%$ ) (Des-Vet Produtos Veterinários, SP, Brasil) correspondendo a 1g de ENR/ kg de ração. A concentração de enrofloxacin na ração foi verificada através de análise cromatográfica (LC-FLD) e o valor obtido foi de 1.047g kg<sup>-1</sup>.

A ração foi dispensada manualmente às 9h30 AM e observado possível regurgitação pelos peixes. A coleta de sangue foi obtida de oito peixes para cada tempo de coleta: 0.5, 1,

2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120h após a sua administração. Para a coleta de sangue (3 mL), o animal foi anestesiado através de imersão em solução de benzocaína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> e posteriormente disposto em superfície, envolto com pano úmido. A punção da veia caudal foi realizada com seringas previamente heparinizadas (10 IU). Por sua vez, o plasma foi separado através de centrifugação (1589 g) por 5 minutos, acondicionado em microtubos de polipropileno de capacidade de 2 mL e armazenados à temperatura de -23°C até o momento das análises.

Após a coleta de sangue, os animais foram pesados, medidos (Tabela 1) e abatidos mediante choque térmico com imersão em banho de gelo. Filetados, acondicionados em sacos plásticos e mantidos à temperatura de -23°C até o momento das análises.

Tabela 1. Valores médios ( $\pm$  DP) obtidos na biometria realizada nos peixes após o abate (n=8).

<b>Tempo (h)</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>CP (cm)</b>
0,5	215,74 $\pm$ 54,60	22,44 $\pm$ 1,07
1	221,26 $\pm$ 32,11	22,63 $\pm$ 1,24
2	198,07 $\pm$ 23,89	21,94 $\pm$ 1,08
4	218,18 $\pm$ 28,19	23,44 $\pm$ 1,57
8	208,55 $\pm$ 33,02	22,06 $\pm$ 1,17
12	223,30 $\pm$ 34,64	22,69 $\pm$ 0,96
24	172,28 $\pm$ 24,31	20,88 $\pm$ 1,27
48	150,94 $\pm$ 27,12	19,94 $\pm$ 1,29
72	155,76 $\pm$ 27,78	20,13 $\pm$ 1,21
96	206,27 $\pm$ 81,83	21,31 $\pm$ 2,84
120	ND	ND

ND = não determinado

### *Análise farmacocinética*

A análise farmacocinética após a administração oral da ENR foi realizada com o auxílio do programa computacional WINNONLIN 5.3 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA), utilizando modelo de um compartimento. O modelo matemático que expressa as variações das concentrações plasmáticas do fármaco após a dose, é dada pela equação:

$$C = C_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

em que:

C = concentração plasmática do fármaco em um determinado tempo

C<sub>0</sub> = concentração plasmática no tempo zero

$e^{-k \cdot t}$  = termo que representa a monoexponencial relacionada com o processo de eliminação do fármaco pelo organismo.

A análise da ENR e seu metabólito ativo (CIP) foram realizados em modelos independentes.

A área sob a curva (AUC) foi calculada pelo método trapezoidal, o tempo de meia-vida ( $T_{1/2, K_e}$ ) calculado por  $T_{1/2, K_e} = 0,693/K_e$ . O Cl (*clearance* ou depuração) foi obtido da  $(\text{dose/kg}) / \text{AUC}$  e o volume de distribuição aparente [ $V_{d(\text{area})}$ ] foi calculado usando  $V_{d(\text{area})} = (\text{dose/kg}) / \text{AUC} \cdot K_e$ , onde  $K_e$  é a constante de eliminação.

Outros parâmetros como tempo máximo e concentração máxima foram observados através dos valores máximos obtidos da curva farmacocinética.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Preparo de amostra**

No desenvolvimento dos métodos de preparo de amostra foram priorizados a menor quantidade de solvente, o menor número de etapas analíticas visando um método rápido e com o menor valor de LOQ possível.

Por serem compostos anfóteros, muitos dos métodos para quantificação de fluoroquinolonas em plasma e tecidos envolvem a precipitação de proteínas com solvente orgânico na presença de uma base ou um ácido (IDOWU & PEGGINS, 2004).

**Plasma.** O método de Mohan et al. (2006) citado por KOC et al. (2009) é um método bem simples que utiliza apenas ACN para precipitação das proteínas presentes no plasma. As modificações feitas foram para otimizar o tempo de preparo. Foi conseguida uma redução de 50% do tempo. As modificações foram no tempo de agitação de 30 segundos e não de 1 minuto e centrifugação de 5 minutos em 1589g ao invés de 3500 g por 10 minutos. Porém, na tentativa de diminuir o extrato final, diminuindo assim o volume de ACN utilizado, não foi possível, devido que em algumas amostras observou-se que necessitavam repetir a limpeza do extrato com o solvente orgânico, na relação 2:1 (agente precipitante:plasma, v/v).

**Músculo.** O trabalho de McMullen et al. (2009) para detecção em fluorescência de fluoroquinolonas em músculo de bagre-americano (*Ictalurus punctatus*), compara dois métodos para a realização do *clean-up*: (i) extração em fase sólida dispersiva com C<sub>18</sub> e (ii) partição líquido-líquido com hexano. A escolha pela segunda (hexano) foi devido à economia de tempo durante o preparo da amostra.

Além disso, preferiu-se partir de 1.0 g de amostra ao invés de 4.0 g; volume total de ACN de 10 mL e não 30 mL. Como o filé de tilápia possui baixo teor de gordura, cerca de 1% (VISENTAINER, et al., 2005), não foram necessárias duas porções de 10mL de hexano e sim, 5 mL uma única vez.

### **Validação dos métodos analíticos**

**Plasma.** A seletividade do método, o primeiro parâmetro avaliado, foi confirmada com a ausência de picos interferentes no intervalo de retenção da CIP, ENR e SAR na análise de 20 brancos da amostra (Figura 6).

Em outro estudo, o de efeito matriz, não foi observado efeito matriz para CIP ou ENR em nenhum dos cinco níveis estudados (Figura 4)

Os resultados de linearidade para CIP e ENR estão expressos na tabela 2. Curvas analíticas foram construídas a partir de brancos de plasma fortificados nos níveis 5, 10, 30, 50 e 100 ng mL<sup>-1</sup> e os valores obtidos apresentaram forte correlação linear, acima de 0.999.

Os gráficos exploratórios de resíduos mostraram a distribuição aleatória dos resíduos, indicando a adequação do modelo de regressão linear criado (Figura 5).

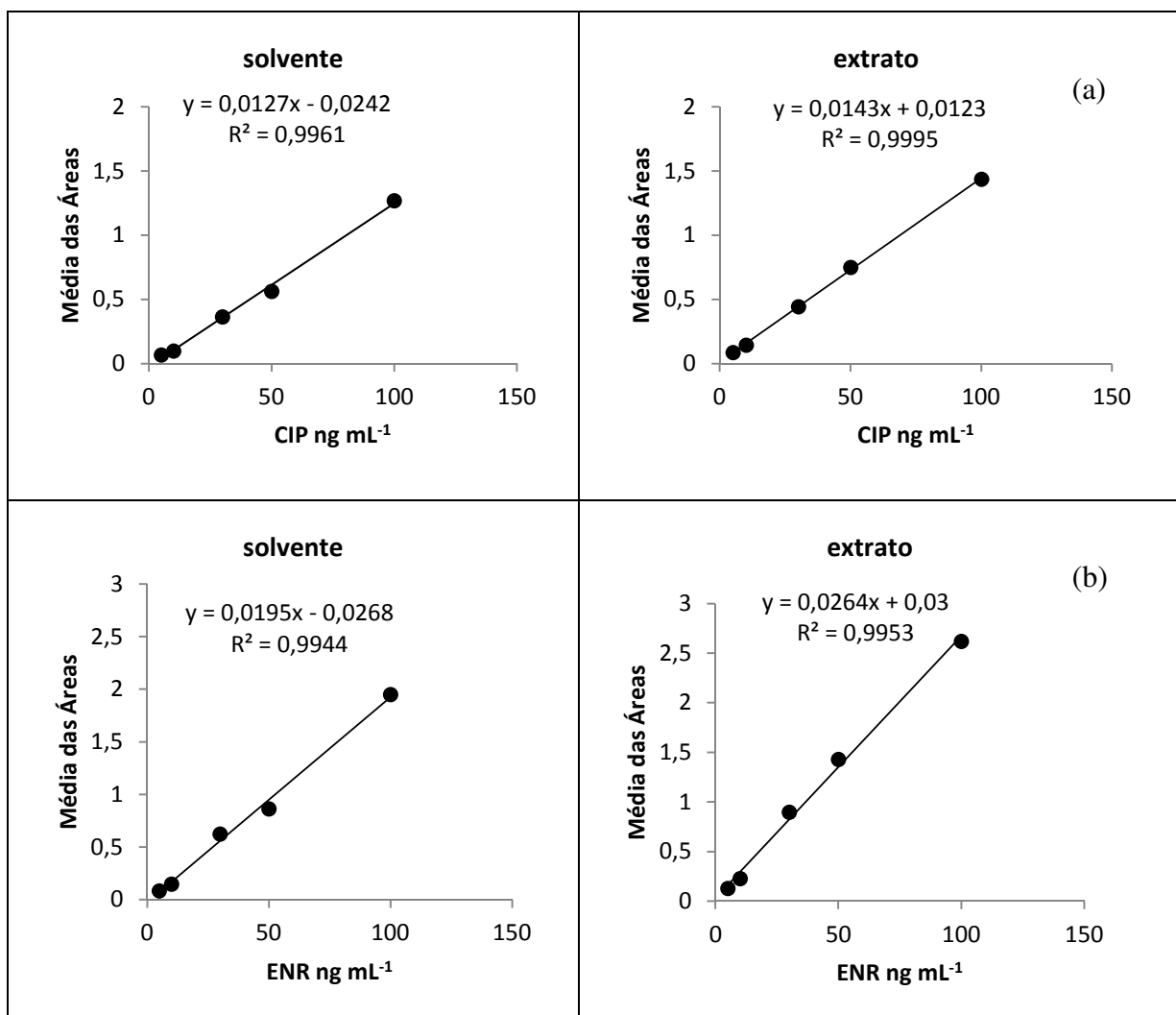


Figura 4. Curvas analítica dos analitos CIP (a) e ENR (b) no solvente e no extrato na faixa de 5 a 100 ng mL<sup>-1</sup> para avaliação de efeito matriz no plasma de tilápia.

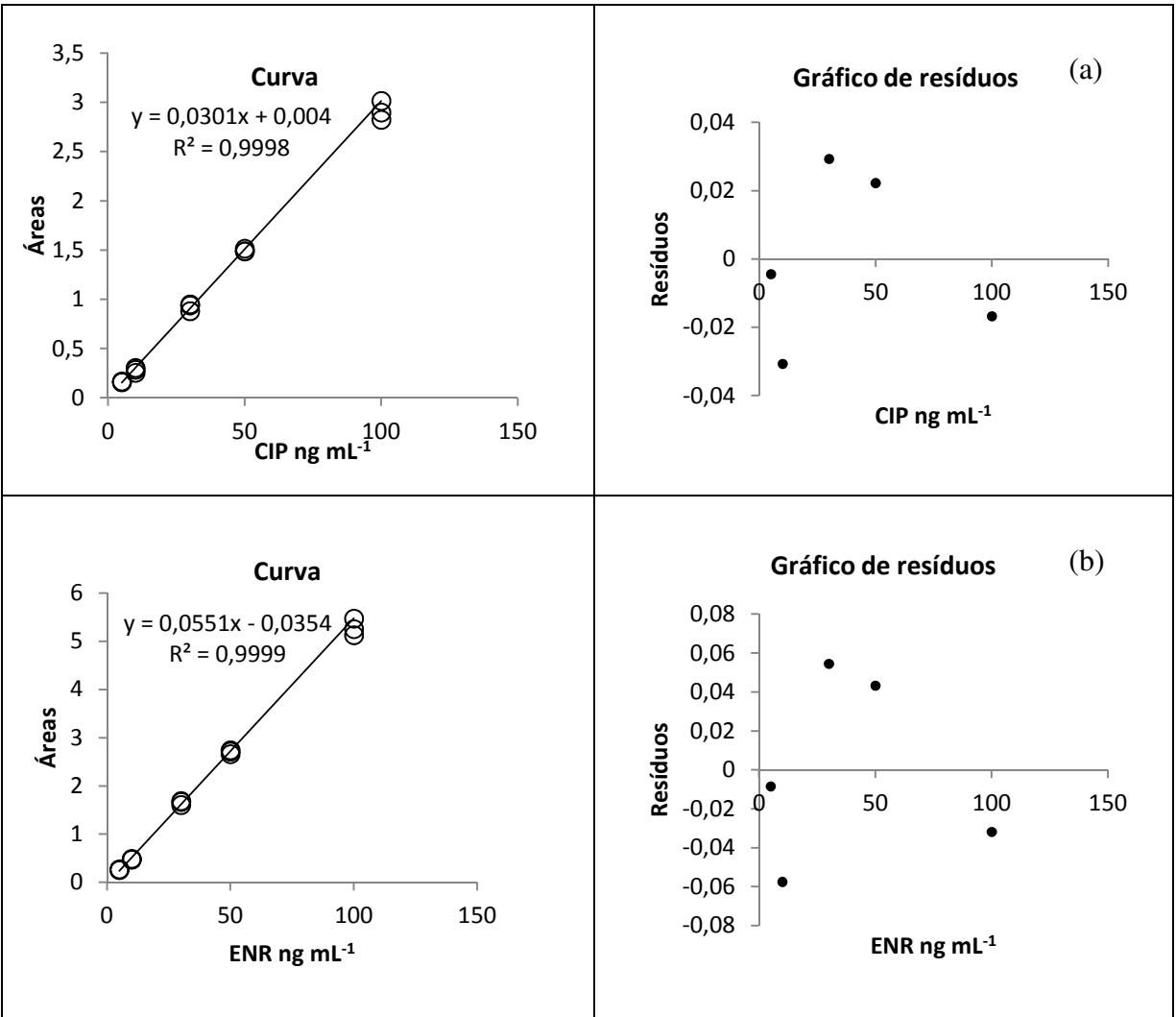


Figura 5. Curvas analíticas para a determinação de CIP (a) e ENR (b) no plasma de tilápia e gráficos de resíduos da regressão

Os resultados de exatidão e precisão do método (Tabela 2) estão de acordo com os valores preconizados pelo FDA e ANVISA. Assim, os valores médios de exatidão estiveram entre 89 – 105% para CIP e 89 – 104% para ENR. Quanto à precisão intradia e interdias, expressas pelo CV (%), estiveram abaixo de 15% como recomenda a FDA (2001) e ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 2. Valores dos parâmetros de validação do método por LC-FLD para determinação de ciprofloxacina (CIP) e enrofloxacin (ENR) no plasma de tilápia.

PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	FLUOROQUINOLONAS	
	CIP	ENR
<b>Faixa de trabalho (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	5 – 100	5 - 100
<b>Linearidade (r<sup>2</sup>)</b>	0,9998	0,9999
<b>Sensibilidade (ua ng mL<sup>-1</sup>)</b>	0,0290	0,0530
<b>LOD (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	2,05	2,12
<b>LOQ (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	3	3
<b>Precisão Intradia (CV %)</b>		
5 ng mL <sup>-1</sup>	6,15	4,01
10 ng mL <sup>-1</sup>	6,54	1,74
30 ng mL <sup>-1</sup>	6,05	5,4
50 ng mL <sup>-1</sup>	1,58	3,68
100 ng mL <sup>-1</sup>	2,59	1,88
<b>Precisão Interdia (CV %)</b>		
5 ng mL <sup>-1</sup>	10,74	4,87
10 ng mL <sup>-1</sup>	7,55	1,94
30 ng mL <sup>-1</sup>	6,60	6,19
50 ng mL <sup>-1</sup>	2,32	3,64
100 ng mL <sup>-1</sup>	2,35	1,91
<b>Exatidão (% Recuperação)</b>		
5 ng mL <sup>-1</sup>	97 - 105	97 - 104
10 ng mL <sup>-1</sup>	89 - 95	89 - 91
30 ng mL <sup>-1</sup>	99 - 103	99 - 103
50 ng mL <sup>-1</sup>	99 - 102	101 - 103
100 ng mL <sup>-1</sup>	99 - 100	99



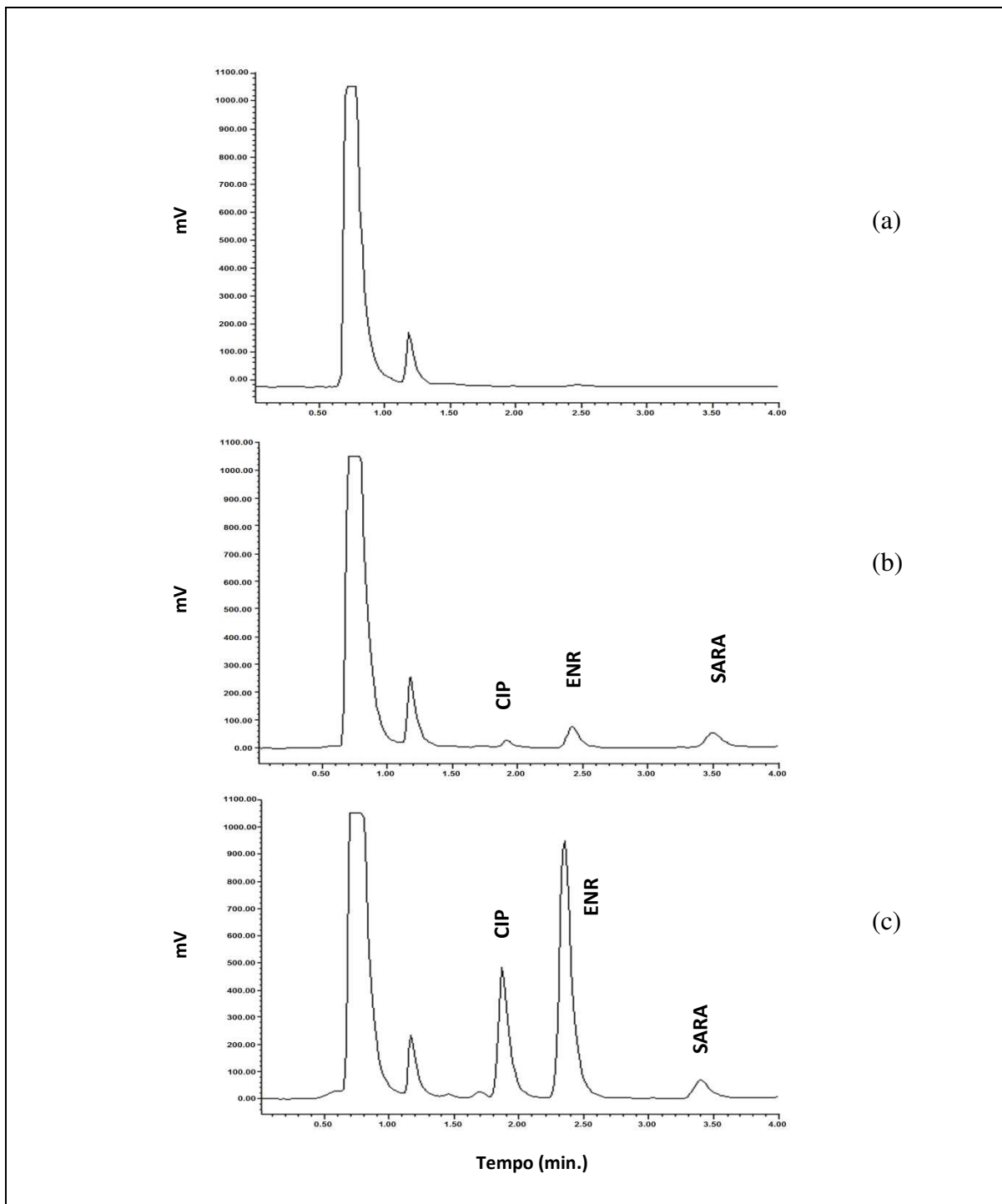


Figura 6. Cromatogramas (LC-FLD) de amostra branco de plasma de tilápia (a); fortificado em 5ng mL<sup>-1</sup> (CIP e ENR); 30ng mL<sup>-1</sup>(SAR) (b) e (c) 100ng mL<sup>-1</sup> (CIP e ENR); 30ng mL<sup>-1</sup>(SAR)

**Músculo.** A seletividade do método foi confirmada com a ausência de picos interferentes no intervalo de retenção da CIP e ENR na análise de 20 brancos da amostra (Figura 9)

Não foi observado efeito matriz em nenhum dos cinco níveis de concentração estudados (Figura 7.)

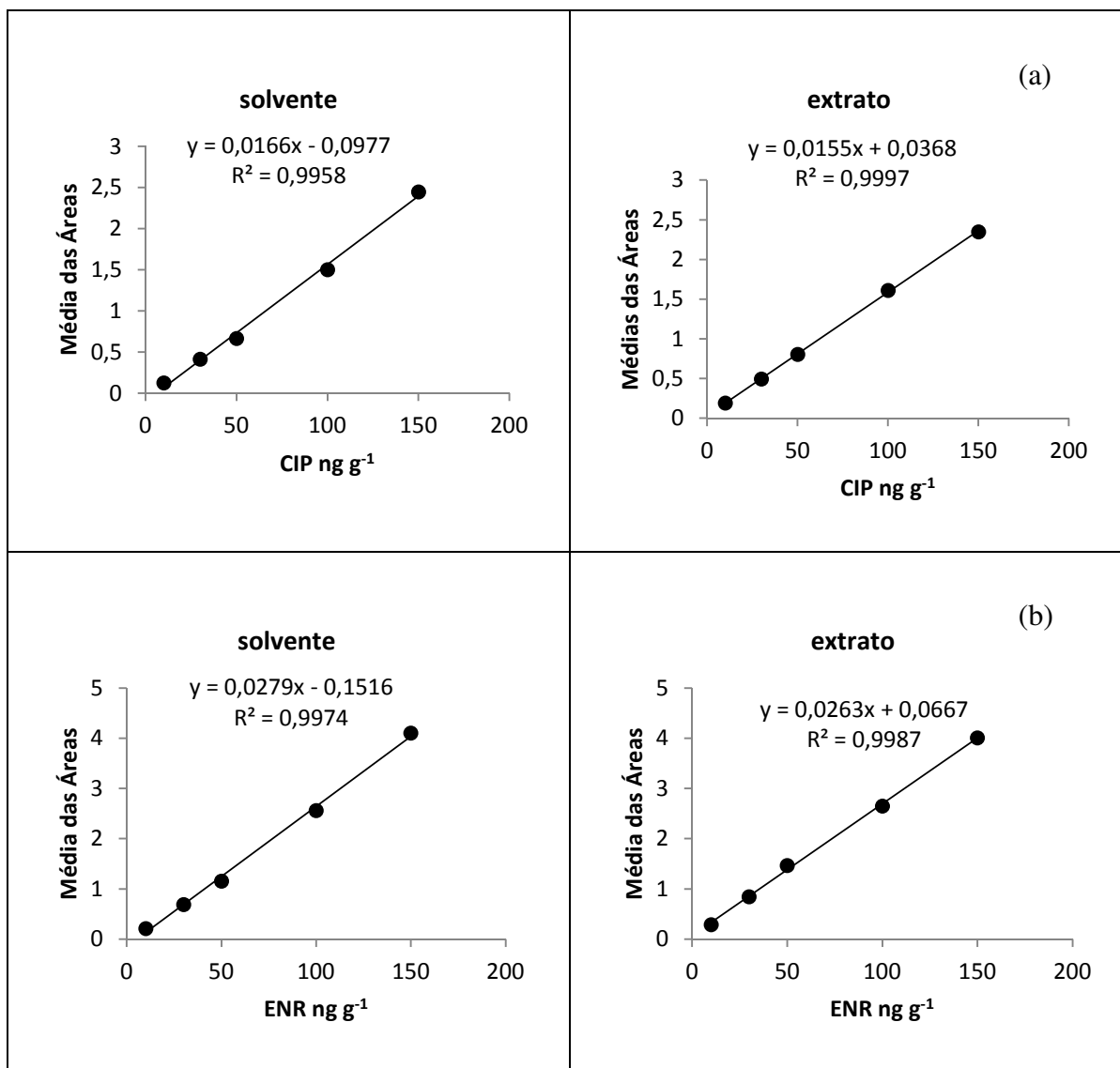


Figura 7. Curvas analíticas dos analitos CIP (a) e ENR (b) no solvente e no extrato na faixa de 10 a 150 ng g<sup>-1</sup> para avaliação de efeito matriz no músculo de tilápia.

Resultados de linearidade para a CIP e ENR obtidas do músculo estão expressos na tabela 3. Curvas analíticas foram construídas a partir de brancos de músculo fortificados nos níveis 10, 30, 50, 100 e 150 ng g<sup>-1</sup> e os valores obtidos apresentaram forte correlação linear, superior a 0.999. Os gráficos exploratórios de resíduos mostram a distribuição aleatória dos resíduos, indicando a adequação do modelo de regressão linear criado (Figura 8.).

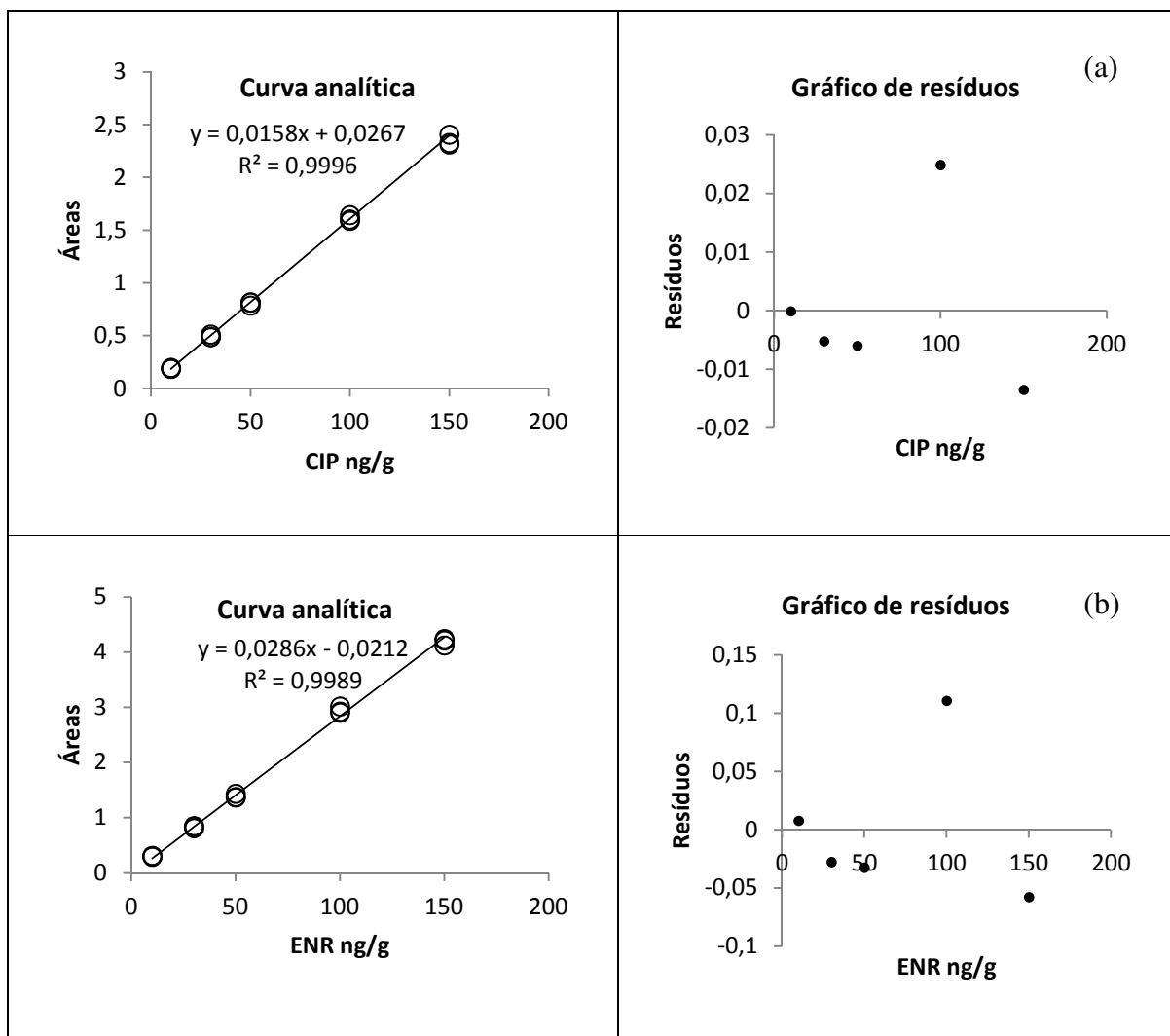


Figura 8 . Curvas analíticas para a determinação de CIP (a) e ENR (b) no músculo de tilápia e gráficos de resíduos da regressão

Tabela 3. Valores dos parâmetros de validação do método por LC-FLD para determinação de ciprofloxacina (CIP) e enrofloxacinina (ENR) no músculo de tilápia.

PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	FLUOROQUINOLONAS	
	CIP	ENR
<b>Faixa de trabalho (ng g<sup>-1</sup>)</b>	10 – 150	10 – 150
<b>Linearidade (r<sup>2</sup>)</b>	0,9999	0,9996
<b>Sensibilidade (ua ng g<sup>-1</sup>)</b>	0,0169	0,0313
<b>LOD (ng g<sup>-1</sup>)</b>	7,33	4,67
<b>LOQ (ng g<sup>-1</sup>)</b>	10	7
<b>Precisão Intradia (CV %)</b>		
10 ng g <sup>-1</sup>	5,72	4,25
30 ng g <sup>-1</sup>	5,83	5,90
50 ng g <sup>-1</sup>	2,37	1,82
100 ng g <sup>-1</sup>	2,74	3,80
150 ng g <sup>-1</sup>	5,20	3,25
<b>Precisão Interdia (CV %)</b>		
10 ng g <sup>-1</sup>	14,51	16,30
30 ng g <sup>-1</sup>	8,63	6,49
50 ng g <sup>-1</sup>	2,38	4,34
100 ng g <sup>-1</sup>	3,64	4,62
150 ng g <sup>-1</sup>	5,76	3,70
<b>Exatidão (% Recuperação)</b>		
10 ng g <sup>-1</sup>	91 – 103	82 – 105
30 ng g <sup>-1</sup>	90 – 103	93 – 98
50 ng g <sup>-1</sup>	99 – 101	97 – 106
100 ng g <sup>-1</sup>	98 – 101	98 – 104
150 ng g <sup>-1</sup>	99 - 103	99 - 102

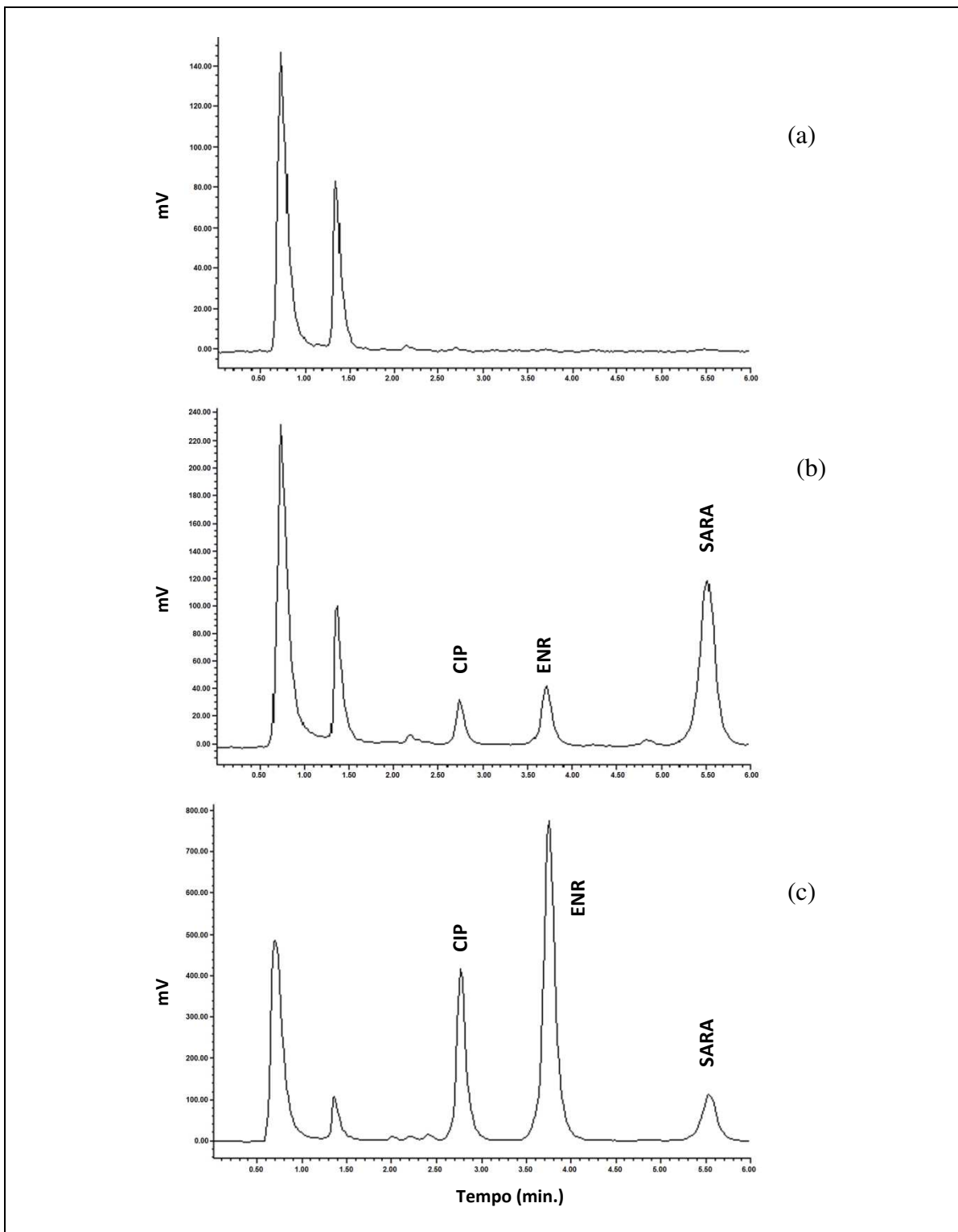


Figura 9. Cromatogramas (LC-FLD) de amostra branco de músculo de tilápia (a); fortificado em 10 ng g<sup>-1</sup> (CIP e ENR); 50 ng g<sup>-1</sup> (SAR) (b) e em (c) 150 ng g<sup>-1</sup> (CIP e ENR); 50 ng g<sup>-1</sup> (SAR).

Os resultados de exatidão e precisão do método (Tabela 3) estão de acordo com os valores preconizados pelo MAPA (BRASIL, 2011). Assim, os valores médios de exatidão estiveram entre 90 – 103% para CIP e 82 – 105% para ENR, sendo aceitos valores entre 80 – 110 %. Quanto à precisão intradia e interdias, expressas pelo CV (%), estas estiveram abaixo de dois terços do valor de referência (20%) para quase todos os níveis estudados, com exceção da precisão interdias no menor nível estudado, no LOQ (10ng g<sup>-1</sup>). Porém, ainda ficou abaixo de 20%.

### Estudos de estabilidade

**Analitos em solução.** As alíquotas de estudo (1mg mL<sup>-1</sup>), no dia da análise, foram descongeladas em temperatura ambiente e diluídas para 10µg mL<sup>-1</sup>. Uma curva analítica (2,5 – 5 – 10 – 15 - 20µg mL<sup>-1</sup>) foi feita a partir de um *pool* de soluções recém-preparadas e as equações obtidas serviram para medir o teor dos analitos das amostras armazenadas. O cálculo da concentração dos analitos das alíquotas armazenadas foi efetuado considerando como 100% a solução desse analito recentemente preparada (EC, 2002) (Figura 10).

O resultado do estudo indicou estabilidade dos analitos em solução no período de estudo (90 dias). Assim, não foi observada a degradação ao longo do estudo pré-determinado.

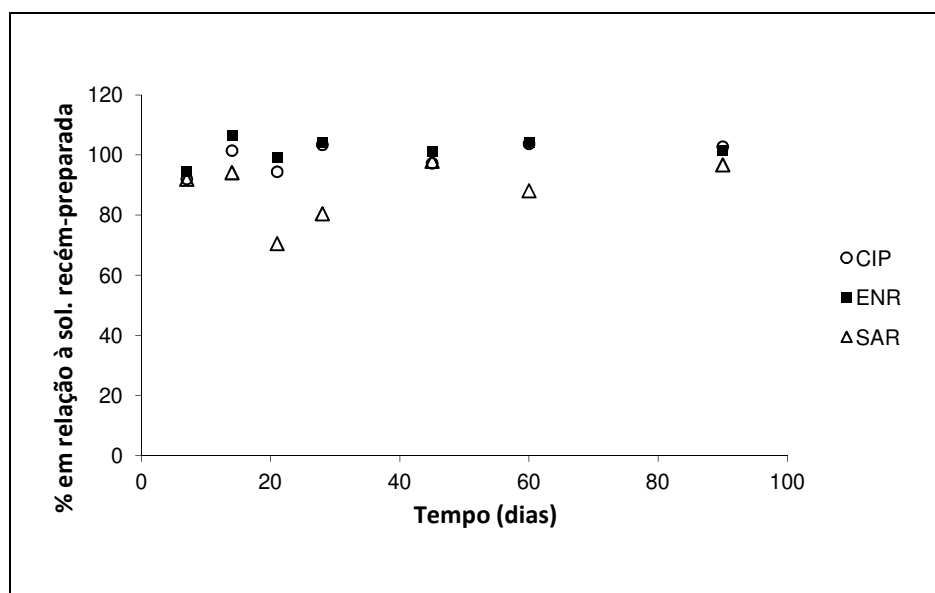


Figura 10. Estabilidade da CIP, ENR, e SAR em solução estoque de 1 mg mL<sup>-1</sup>.

A concentração dos analitos nos extratos aquosos de plasma e músculo não sofreram alterações significativas dentro do amostrador automático em temperatura ambiente num período máximo de até 12 horas.

**Analitos no plasma.** A maioria dos trabalhos consultados, as amostras de plasma após coleta, permaneceram em ultrafreezer (-80°C) até o momento da análise.

Por não haver informações sobre estabilidade da ENR e CIP em plasma de peixe na literatura, optou-se em realizar um estudo de 90 dias com amostras fortificadas em três diferentes níveis (baixo, médio e alto), armazenadas a -23°C. O intervalo de tempo estudado foi o período máximo em que as amostras ficariam armazenadas no freezer, aguardando por análise.

Os resultados de estabilidade da ENR e CIP em plasma estão apresentados nas figuras 11, 12 e 13 que demonstram a estabilidade dos analitos na matriz dentro do período estudado. Observa-se que não houve diferença significativa entre as amostras nos diferentes níveis de fortificação.

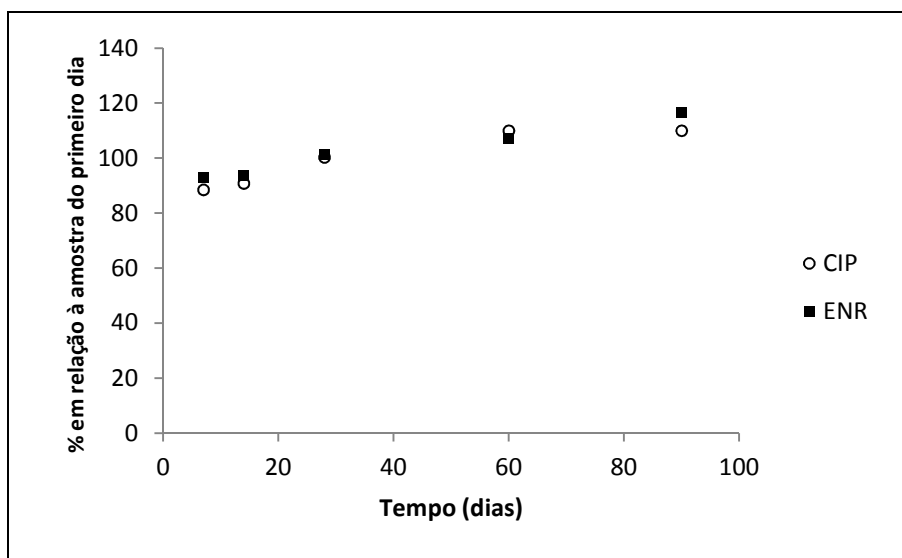


Figura 11. Estabilidade da CIP e ENR em amostras de plasma fortificadas (30ng mL<sup>-1</sup>).

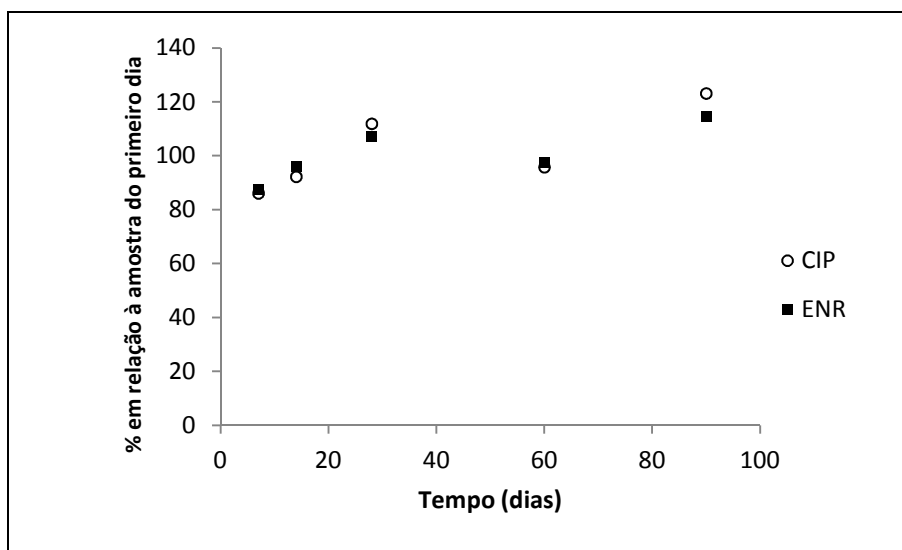


Figura 12. Estabilidade CIP e ENR em amostras de plasma fortificadas (100ng mL<sup>-1</sup>)

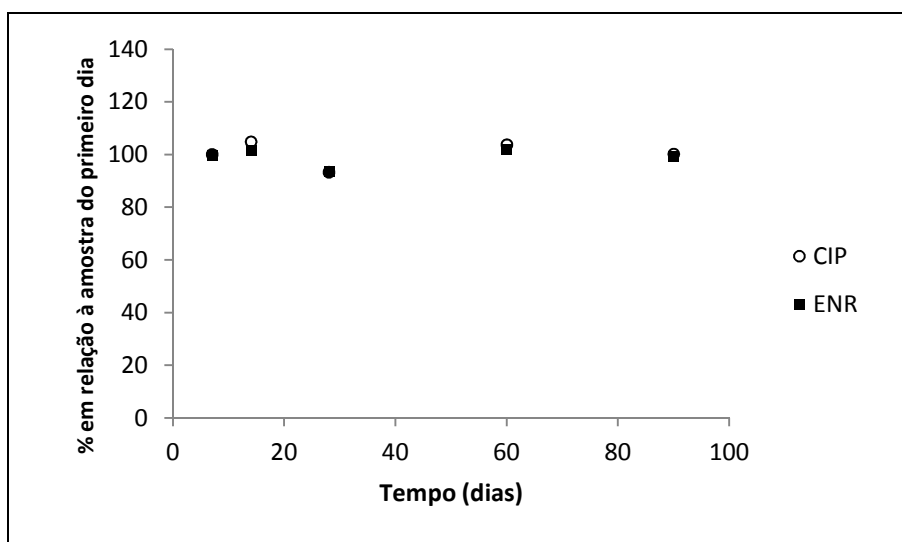


Figura 13. Estabilidade da CIP e ENR em amostras de plasma fortificadas (1000ng mL<sup>-1</sup>).



### Análise das amostras de plasma e músculo de tilápia

Para cada tempo de coleta foram analisadas em duplicata amostras de plasma de 8 animais. O objetivo foi analisar todas as amostras em triplicata. Porém, trabalhando com peixes menores (150 a 200g), o volume de punção máxima de sangue de 3mL realizado não foi suficiente para a obtenção de um pouco mais que 1,5mL de amostra (plasma).

É importante mencionar que em algumas poucas amostras de plasma, após o descongelamento, estavam geleificadas impedindo o preparo das mesmas. No entanto, outras que não geleificaram totalmente, a homogeneização ficou prejudicada.

As amostras de músculo sem pele foram todas quantificadas em triplicata.

Os valores médios das concentrações obtidas de CIP e ENR para plasma e músculo estão apresentadas na Tabela 4 e a relação da distribuição delas entre músculo e plasma estão na tabela 5.

Tabela 4. Concentração (média  $\pm$  DP) de ciprofloxacina (CIP) e enrofloxacin (ENR) em plasma e músculo após única administração oral (10mg kg<sup>-1</sup>(p.v)) em tilápia (n=8).

Tempo (h)	CIP		ENR	
	plasma ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	músculo* ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	plasma ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	músculo* ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
0,5	< LOD	< LOD	0,082 $\pm$ 0,032	0,097 $\pm$ 0,047
1	< LOD	< LOD	0,179 $\pm$ 0,067	0,367 $\pm$ 0,118
2	< LOQ	0,015 $\pm$ 0,009	0,284 $\pm$ 0,065	1,087 $\pm$ 0,265
4	0,012 $\pm$ 0,005	0,025 $\pm$ 0,014	0,866 $\pm$ 0,378	1,409 $\pm$ 0,586
8	0,015 $\pm$ 0,005	0,063 $\pm$ 0,016	1,241 $\pm$ 0,423	2,166 $\pm$ 0,742
12	0,013 $\pm$ 0,006	0,072 $\pm$ 0,026	1,088 $\pm$ 0,425	1,860 $\pm$ 0,919
24	0,015 $\pm$ 0,005	0,096 $\pm$ 0,024	0,887 $\pm$ 0,083	1,236 $\pm$ 0,364
48	0,004 $\pm$ 0,005	0,010 $\pm$ 0,011	0,170 $\pm$ 0,109	0,194 $\pm$ 0,105
72	< LOD	< LOD	0,058 $\pm$ 0,015	0,069 $\pm$ 0,023
96	< LOD	< LOQ	0,036 $\pm$ 0,025	0,045 $\pm$ 0,018
120	< LOD	< LOD	0,024 $\pm$ 0,010	0,036 $\pm$ 0,012

\*sem pele

Tabela 5. Relação da concentração de enrofloxacina e ciprofloxacina no músculo e plasma de tilápia após única administração oral de 10 mg kg<sup>-1</sup> de ENR (n = 8).

Tempo (h)	Relação entre as concentrações músculo/plasma ( <i>ratio</i> )	Relação entre as concentrações músculo/plasma ( <i>ratio</i> )
	CIP	ENR
0,5	ND	1,18
1	ND	2,04
2	ND	3,82
4	2,03	1,62
8	4,19	1,74
12	5,39	1,71
24	6,24	1,34
48	2,54	1,14
72	ND	1,12
96	ND	1,26
120	ND	1,48

ND = não determinado

### Análise farmacocinética

Estudos de dose única, por via oral com enrofloxacina já foram realizados em diversas espécies de vários países, em sua maioria espécies de países europeus e de águas frias. Especialmente com tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) na literatura ainda não estão disponíveis informações com ensaios de dose única. Apenas o trabalho de Xu et al. (2006), traz informações referentes à ensaio de dose múltipla em tilápia-do-Nilo realizado durante 7 dias com dose usual na aquicultura chinesa de 50mg kg<sup>-1</sup>.

Valores máximos da ENR ( $C_{max} = 1.241 \pm 0.423 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), no presente trabalho, foram encontrados no plasma após 8 horas ( $T_{max}$ ) e no músculo ( $C_{max} = 2.166 \pm 0.742 \mu\text{g g}^{-1}$ ) após a administração da ração medicada demonstrando uma absorção lenta a partir do trato gastrointestinal. Estes valores foram decaindo lentamente com meia-vida longa de 2.08 dias no músculo, sendo quantificáveis no plasma ( $0.024 \pm 0.010 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e no músculo ( $0.036 \pm 0.012 \mu\text{g g}^{-1}$ ) até o último tempo de coleta (120h). A ciprofloxacina (CIP), seu metabólito, foi detectada e quantificada no plasma e no músculo até 48h.

Na maioria dos animais produtores de alimentos como bovinos, suínos e frangos, a CIP é o principal metabólito obtido por n-desalquilação da ENR no citocromo P450 (CYP450) durante a fase I de biotransformação. Outros metabólitos provenientes das

reações de glucuronidação na fase II ocorrem em menos de 10% do resíduo total. (ALTREUTHER & KLOSTERMANN, 1994; MARTINEZ et al., 2006).

Espécies de peixes como Dourada (*Sparus aurata L.*) (DELLA ROCCA et al., 2004), Truta-marrom (*Salmo trutta fario*) (KOC et al., 2009) e Silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) (FANG et al., 2011) não biotransformam ENR em CIP. Isso pode ocorrer porque nem todas as espécies possuem as mesmas rotas metabólicas (KOC et al., 2009). No entanto, espécies como Robalo (*Dicentrarchus labrax*) e Salmão do Atlântico (*Salmo salar*), quando medicados com ENR, apresentam altas concentrações do metabólito no fígado, muito pouco no plasma e nada nos tecidos comestíveis (INTORRE et al., 2000; STOFFREGEN et al., 1997). Essas diferenças de metabolismo nos peixes, segundo TANG et al. (2006), citado por DANYI et al. (2010), são possíveis em virtude das diferenças de atividade do citocromo P450 de cada espécie.

Diferentemente de outras espécies animais, incluem-se aqui os homeotermos (mamíferos e aves), neste trabalho, a taxa de conversão da ENR em CIP na tilápia foi de 1.3% ( $AUC_{\text{ciprofloxacina}}/AUC_{\text{enrofloxacina}}$ ). O valor é baixíssimo se comparado com de outros animais (suínos e bovinos, por exemplo) - 10% a 55% e ainda menor do que em outras espécies de peixes como Pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*) e Korean catfish (*Silurus asotus*) (4%) (RIVIERI & PAPICH, 2009; USP, 2003; DANYI et al., 2010; KIM et al., 2006).

O pacu-vermelho (*Colossoma brachypomum*) é outra espécie de peixe que metaboliza enrofloxacina em ciprofloxacina, porém sua taxa de conversão não está descrita na literatura (LEWBART et al., 1997).

Estudos farmacocinéticos com enrofloxacina também já foram realizados em diferentes condições experimentais – dose (5 a 50 mg kg<sup>-1</sup>), vias de administração (oral por gavagem, oral através de ração medicada, intravenoso, intramuscular e por imersão) e em diferentes condições ambientais (temperatura, salinidade, pH, entre outros) (INTORRE et al., 2000). Todas essas variáveis citadas somadas à variabilidade intra-espécie, afetam de maneira importante os parâmetros farmacocinéticos e devem ser levadas em consideração (MARTÍN-JIMÉNEZ & RIVIERE, 1998).

Os valores dos parâmetros farmacocinéticos da CIP e ENR nas amostras de plasma e músculo estão apresentados nas Tabelas 6 e 7 e os perfis cinéticos representados nas figuras 14 e 15.

Tabela 6. Parâmetros farmacocinéticos no plasma determinados após única administração oral de enrofloxacin (10mg kg<sup>-1</sup> p. v) em tilápias (n=8).

Parâmetros	Unidades	Ciprofloxacina	Enrofloxacin
AUC <sub>0→t</sub>	h µg mL <sup>-1</sup>	0.53	38.61
AUC <sub>0→∞</sub>	h µg mL <sup>-1</sup>	0.92	39.74
C <sub>max</sub>	µg mL <sup>-1</sup>	0.01	1.24
T <sub>1/2 Ke</sub>	h	36.89	19.36
T <sub>max</sub>	h	8	8
K <sub>e</sub>	1/h	0.02	0.04
V <sub>d (area)</sub>	L kg <sup>-1</sup>	576.95	7.03
Cl	L h kg <sup>-1</sup>	10.84	0.25

AUC = área sob a curva; C<sub>máx.</sub> = concentração máxima; T<sub>1/2 Ke</sub> = tempo de meia-vida; T<sub>máx</sub> = tempo máximo; K<sub>e</sub> = constante de eliminação; V<sub>d (area)</sub> = volume de distribuição aparente; Cl = *clearance*.

Tabela 7. Parâmetros farmacocinéticos no músculo determinados após única administração oral de enrofloxacin (10mg kg<sup>-1</sup> p. v) em tilápias (n=8).

Parâmetros	Unidades	Ciprofloxacina	Enrofloxacin
AUC <sub>0→t</sub>	h µg g <sup>-1</sup>	2.96	60.19
AUC <sub>0→∞</sub>	h µg g <sup>-1</sup>	3.10	62.79
C <sub>max</sub>	µg g <sup>-1</sup>	0.09	2.16
T <sub>1/2 Ke</sub>	h	18.83	50.03
T <sub>max</sub>	h	24	8
K <sub>e</sub>	1/h	0.04	0.01
V <sub>d (area)</sub>	L kg <sup>-1</sup>	87.51	11.50
Cl	L h kg <sup>-1</sup>	3.22	0.16

AUC = área sob a curva; C<sub>máx.</sub> = concentração máxima; T<sub>1/2 Ke</sub> = tempo de meia-vida; T<sub>máx</sub> = tempo máximo; K<sub>e</sub> = constante de eliminação; V<sub>d (area)</sub> = volume de distribuição aparente; Cl = *clearance*.

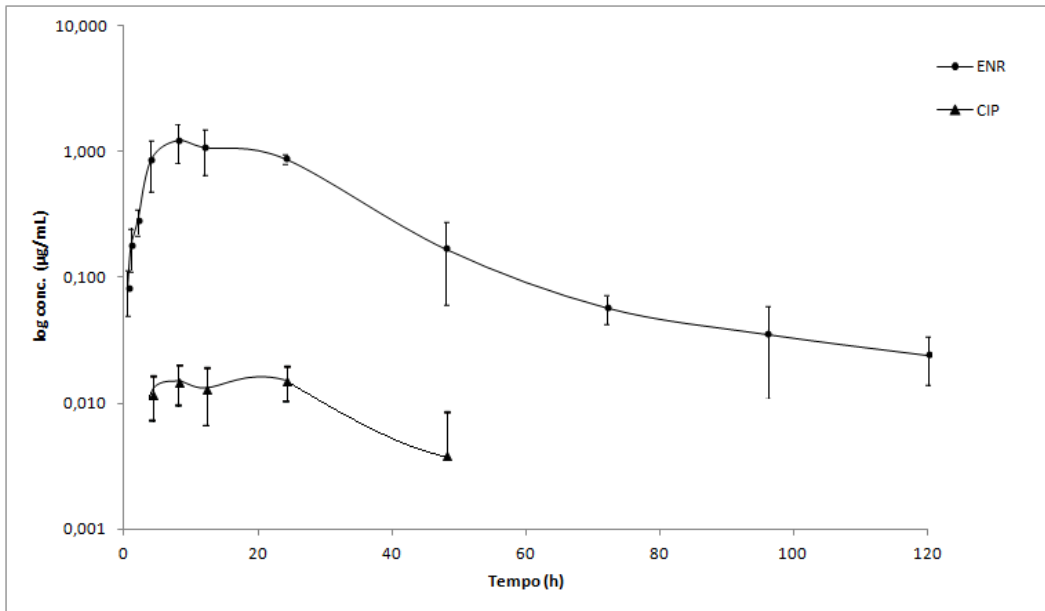


Figura 14. Curva semi-logarítmica da concentração no plasma *versus* tempo em tilápia-do-Nilo após única administração oral de enrofloxacin na dosagem de 10 mg kg<sup>-1</sup> (p.v) (média ± DP, n = 8).

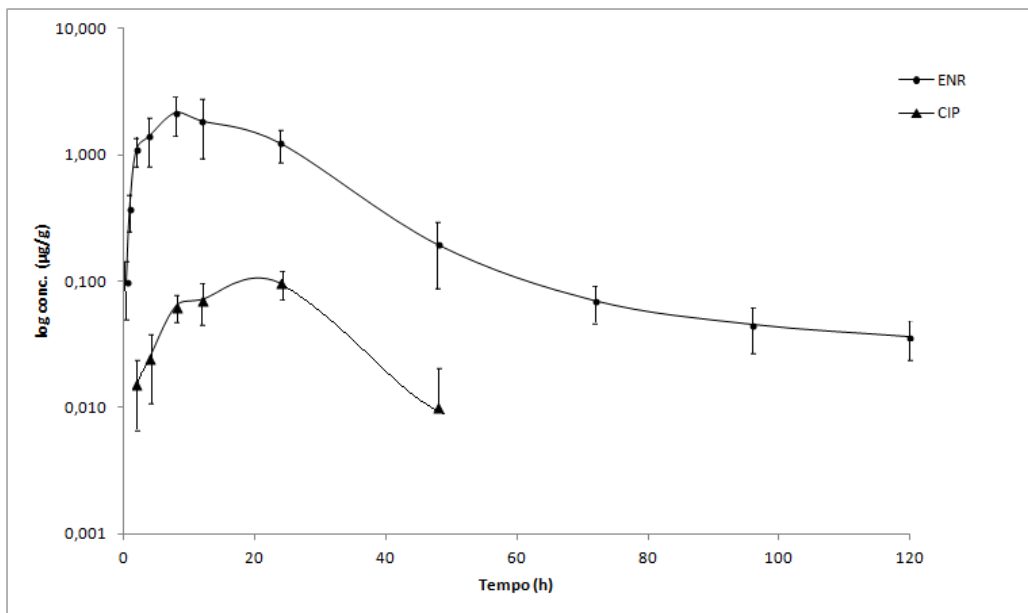


Figura 15. Curva semi-logarítmica da concentração no músculo *versus* tempo em tilápia-do-Nilo após única administração oral de enrofloxacin na dosagem de 10 mg kg<sup>-1</sup> (p.v) (média ± DP, n = 8).

A cinética observada no estudo demonstrou que a absorção oral ( $T_{\max} = 8$  horas) para CIP e ENR provavelmente tenha sido prejudicada pela ingestão concomitante com alimento (interação fármaco-alimento), tornando seu processo lento. A absorção de qualquer fluoroquinolona é inibida por cátions bivalentes como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  provenientes de alimentos enriquecidos (KIM & NIGHTINGALE, 2000; USP, 2003). Rações comerciais destinadas à aquicultura são enriquecidas com esses metais.

Por outro lado, quando a administração oral é realizada por gavagem sem a presença de alimento, os valores encontrados de  $T_{\max}$  são menores. KIM et al. (2006) obteve  $T_{\max}$  de 3.44h para ENR num ensaio utilizando gavagem. Em contrapartida, o trabalho de DELLA ROCCA et al. (2004) realizado com administração oral através de ração medicada em condições experimentais semelhantes ao do presente trabalho obteve o mesmo valor de  $T_{\max}$  (8h).

O elevado valor de  $V_d$  ( $>1\text{L kg}^{-1}$ ) juntamente com a baixa ligação às proteínas confere alta penetração nos tecidos pelas fluoroquinolonas (LODE et al., 1998; KIM & NIGHTINGALE, 2000). Isso alia vantagem à enrofloxacin, pois muitas das bactérias patogênicas causam lesões e abscessos na pele e no músculo dos peixes (DING et al., 2006). Assim, através dos cálculos de *ratios* observou-se maior concentração do fármaco no tecido muscular em relação ao plasma. Os valores de *ratios* para ENR (1.12 a 3.82) apresentados na tabela 7 foram superiores aos reportados por INTORRE et al. (2000) (0.15 a 0.88) e DELLA ROCCA et al., (2004) (0.16 a 0.33) nas espécies Robalo (*Dicentrarchus labrax*) e Dourada (*Sparus aurata L.*), respectivamente.

Outra característica das fluoroquinolonas é o longo tempo de meia-vida que possuem, o que permite intervalos maiores na posologia ou até mesmo a administração em dose única (TOUTAIN & BOUSQUET-MÉLOU, 2004).

O  $T_{1/2}$  nos peixes, em geral, é maior do que de outros animais. Suínos e bovinos de 2 a 8h e coelhos com curto  $T_{1/2}$  de 1.8 a 2.5h (WANG et al., 2012). Porém o  $T_{1/2}$  de 19.36h (plasma) obtido para a tilápia é menor quando comparado ao de outros peixes de águas mais quentes (24-26°C), como Korean catfish (*Silurus asotus*) - 34h e Silver crucian carp (*Carassius auratus*) – 62.7h (KOC et al., 2009; FANG et al., 2011).

Sabe-se que o valor de  $T_{1/2}$  é mais elevado em esquema de dosagem múltipla do que em uma única administração. Isso porque o  $T_{1/2}$  obtido de dosagem única não possui

acumulação terapeuticamente relevante, diferentemente de quando há esquema de dosagem repetida (TOUTAIN & BOUSQUET-MÉLOU, 2004; WANG et al., 2012).

Estudo realizado com difloxacina em *Crucian carp* (*Carassius auratus*), exemplifica como as diferenças de esquema de dosagem e temperatura afetam diretamente o  $T_{1/2\beta}$  nessa espécie. Neste estudo, os autores compararam a cinética na administração em dose única ( $20\text{mg kg}^{-1}$ ) e múltipla ( $20\text{mg kg}^{-1}$  por 3 dias) em diferentes temperaturas ( $10^{\circ}\text{C}$  e  $20^{\circ}\text{C}$ ) e obtiveram tempos de meia-vida significativamente mais longos a  $10^{\circ}\text{C}$  (95.36h) do que a  $20^{\circ}\text{C}$  (48.93h) e após o tratamento,  $T_{1/2\beta}$  no músculo de 157.5h a  $10^{\circ}\text{C}$  e 66.6h a  $20^{\circ}\text{C}$  (DING et al., 2006).

O alto valor de  $T_{1/2}$  no músculo obtido na tilápia (2.08 dias) sugere acumulação do fármaco em administrações repetidas o que tem como consequência valores de estimativa de período de carência maiores.

Na literatura há pouquíssimas informações a respeito de ensaios com dose múltipla com enrofloxacina para definição de período de carência, tendo conhecimento apenas três trabalhos: (i) Luchetti et al. (2004) , (ii) Danyi et al. (2010) e (iii) Paschoal et al. (2013) nas espécies Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), Pangásius (*Pangasianodon hypophthalmus*) e Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), respectivamente. Infelizmente cada ensaio foi conduzido de maneiras muito distintas: diferentes doses ( $10$  a  $20\text{ mg kg}^{-1}$ ), tempos de tratamento ( $5$  a  $10$  dias) e temperaturas ( $13.25$  a  $32^{\circ}\text{C}$ ), obtendo como resposta, tempos de carência estimados para cada uma das espécies também muito variáveis (de  $8$  a  $59$  dias).

Os valores de CIM para enrofloxacina frente aos patógenos mais comuns em peixes variam de  $0.0064$  a  $0.032\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  (DALSGAARD & BJERREGAARD, 1991). Exceto para *Streptococcus* sp,  $0.34\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  (BRAGG & TODD, 1988 citado por BOWSER & BABISH, 1991).

Segundo, Aliabadi & Lees (2000), os autores sugerem que para melhor eficácia do regime terapêutico e o mínimo risco de resistência, a relação  $\text{AUC}_{0-24\text{h}}/\text{CIM}$  deve ser entre  $125-250$  e  $C_{\text{max}}/\text{CIM}$  deve ser entre  $10-12$  para as fluoroquinolonas. Após a administração oral de  $10\text{ mg kg}^{-1}\text{p.v}$  em tilápia-do-Nilo, pode-se afirmar que para a maioria dos patógenos comuns em peixes, os valores obtidos a partir das concentrações plasmáticas da ENR foram bem satisfatórios, ( $3467 - 693$  e  $194 - 39$ ), exceto para *Streptococcus* sp ( $65.26$  e  $3.64$ ). No

entanto, esses valores não expressam a realidade, já que foram obtidos há mais de duas décadas e não são referentes aos patógenos encontrados na tilapicultura brasileira.

## CONCLUSÕES

As metodologias analíticas desenvolvidas para a determinação de ENR e CIP em plasma e músculo atenderam aos requisitos dos guias de validação, bem como são métodos simples e rápidos. O uso do detector de fluorescência, além de ser seletivo foi adequado para a quantificação desses analitos.

Os resultados aqui obtidos mostraram que a ENR alcançou concentrações elevadas no plasma e apresentou ótima penetração no tecido muscular. O seu metabólito ativo, a ciprofloxacina, foi detectado, porém em baixíssimas concentrações, podendo-se dizer que a tilápia-do-Nilo cultivada nas condições desse experimento quase não biotransforma ENR em CIP, algo interessante quando se deseja estudos com dosagens múltiplas (tratamento) e estimativas do período de carência.

O presente estudo foi conduzido em condições laboratoriais, condições essas que diferem da realidade quando existem peixes doentes e inapetentes. Assim, para que seja feito de forma racional o uso da enrofloxacin, é necessário a definição dos valores de CIM para bactérias relevantes na tilapicultura nacional.e realização de estudo com modelo animal de infecção. A falta dessas informações inviabiliza a obtenção dos índices PK/PD e, portanto, na determinação de um regime terapêutico de máxima eficácia e mínimo risco de resistência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTREUTHER, P. & KLOSTERMANN, L. **Unpublished summary of the Enrofloxacin metabolism and residue information submitted to the FAO experts**. Submitted to WHO by Bayer AG, Leverkusen, Germany, 1994.

ALIABADI, F.S; LEES, P. Antibiotic treatment for animals:effect on bacterial population and dosage regimen optmisation. **International Journal of Antimicrobial Agents**.n. 14, p. 307-313, 2000.



- BRASIL, 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.**, Brasília.
- BRASIL, 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários.** Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 72p
- BRASIL, 2012. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura – Brasil 2010.** Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/topicos/300-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2010>> Acesso em: 20 set. 2012.
- BOWSER, P. R.; WOOSTER G. A; LEGER, J.; BABISH, J. G. Pharmacokinetics of enrofloxacin in fingerlings rainbow trout. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.**v. 15, p. 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, p. 97-109, 2001.
- CPVS-SINDAN. Compêndio de Produtos Veterinários. Disponível em: <<http://www.cpvs.com.br/cpvs/index.html>> Acesso em: agosto de 2012.
- DALSGAAD, I; BJERREGAARD, J. Enrofloxacin as an antibiotic in fish. **Acta Veterinary Scandinavica.** n. 87, p. 300-302, 1991.
- DANYI, S.; WIDART, J.; DOUNY, C; DANG, P. K.; BAIWIR, D.; WANG, N.; TU, H. T; TUNG, V. T.;PHUONH, N. T; KESTEMONT, P.; SCIPPO, M. L. Determination and kinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in Tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) and giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) using liquid chromatography/mass spectrometry method. **Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics.** v.34, p. 142-152, 2010.
- DELLA ROCCA, G.; DI SALVO, A.; MALVISI, J.; SELLO, M. The disposition of enrofloxacin in seabream after single intravenous injection or from medicated feed administration. **Aquaculture.** n. 232, p. 53-62, 2004.
- DING, F; CAO, J; MA, L; PAN, Q.; FANG, Z; LU, X. Pharmacokinetics and tissues residues of difloxacin in crucian carp (*Carassius auratus*) after oral administration. **Aquaculture.** 256, .p. 121-128, 2006.
- EC, 2002. European Comission. Official Journal of the European Communities,(2002/657/CE) de 17/08/2002, L221/8-36.

- EMA – European Medicines Agency. 2011. Anexo I: Lista das denominações, forma farmacêutica, dosagem do medicamento veterinário, espécies animais, via de administração e requerente nos estados-membros. Disponível em: <[http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/Referrals\\_document/Enrok\\_33/WC500060467.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/Referrals_document/Enrok_33/WC500060467.pdf)>. Acesso em fevereiro de 2011.
- FANG, X.; LIU, X.; LIU, W; LU. C. Pharmacokinetics of enrofloxacin in allogynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**.v. 35, p. 397-401, 2011.
- FDA, 2001 - Food Drug and Administration. **Guidance for Industry, Bioanalytical method validation**, maio de 2001.
- FDA, 2012 – Food Drug and Administration. Disponível em : <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/animaldrugatfda/index.cfm?gb=2>> Acesso em março de 2012.
- FDA, 2013 - Food Drug and Administration. Disponível em: <<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2005-08-01/html/05-15224.htm>> Acesso em: junho de 2013.
- GORE, S. R.; HARMS, C. A.; KUKANICH. B; FORSYTHE, J.; LEWBART, G. A.; PAPICH, M. G. Enrofloxacin pharmacokinetics in the European cuttlefish after a single i. v injection and bath administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v.28, p. 433-439, 2005.
- GUARDABASSI, L; JENSEN, L. B; KRUSE, H. **Guia de antimicrobiano em veterinária**. Porto Alegre, 2008. 266p.
- IDOWU, O. R; PEGGINS, J. O. Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. n. 35, p. 143-153, 2004.
- INTORRE, L.; CECCHINI, S.; BERTINI, S.; COGNETTI VARRIALE, A. M.; SOLDANI, G.; MENGOZZI, G. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass. **Aquaculture**. n.182, p. 49-59, 2000.
- KIM, M-K; NIGHTINGALE, C. H. **The Quinolones**. 3ª edição.2000. 169-202p
- KIM, M. S.; LIM, J. H; PARK, B. K; HWANG, Y. H; YUN, H. I. Pharmacokinetics of enrofloxacin in Korean catfish. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**.v.29, p. 397-402, 2006.

- KOC, F; UNEY, K; ATAMANALP, M; TUMER, I; KABAN, G. Pharmacokinetic disposition of enrofloxacin in brown trout (*Salmo trutta fario*) after oral and intravenous administrations. **Aquaculture**, v. 295, p. 142-144, 2009.
- LEWBART, G.; VADEN, S.; DEEN, J; MANAUGH, C; WHITT, D.; DOI, A.; SMITH, T; FLAMMER, K. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the red pacu after intramuscular, oral and bath administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**.v. 20, p.124-128, 1997.
- LODE, H.; BORNER, K.; KOEPPE, P. Pharmacodynamics of fluoroquinolones. **Clinical Infectious Disease**. 27, p33-39, 1998.
- LUCCHETTI. D; FABRIZI, L; GUANDALINI, E; PODESTÀ, E; MARVASI, L; ZAGHINI, A; CONI. E. Long depletion time of enrofloxacin rainbow trout. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.48, n. 10, p.3912-3917, 2004.
- MARTÍN-JIMÉNEZ, T.; RIVIERE, J. E. Population pharmacokinetics in veterinary medicine: potential use for therapeutic drug monitoring and prediction of tissue residues. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**..v. 21, p.167-189, 1998.
- MARTINEZ, M.; McDERMOTT, P.; WALKER, R. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. **The Veterinary Journal**. n. 172: p.10-28, 2006.
- MARTINSEN, B.; HORSBERG, T. E. Comparative single-dose pharmacokinetics of four quinolones, oxolinic acid, flumequine, sarafloxacin and enrofloxacin in Atlantic salmon held in seawater at 10°C. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**.v. p.39, 1059-1064, 1995.
- McMULLLEN, S. E; SCHENCK, F. J; VEGA, V. A. Rapid method for the determination and Confirmation of fluoroquinolone residues in catfish using liquid chromatography/fluorescence detection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**. v. 92, n. 4, p.1233-1240, 2009.
- MOHAN, J; SASTRY, K. V. H; TYAGI, J. S; RAO, G. S; SINGH, R. V. Residues of fluorquinolone drugs in the cloacal gland and other tissues of Japanese quail. **Brit. Poultry Science**. n. 47, p.83-87, 2006.
- PASCHOAL,J. A. R; QUESADA, S. P; GONÇALVES, L. U; CYRINO, J. E. P; REYES, F. G. R. Depletion study and estimation of the withdrawal period for enrofloxacin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, p.1-9, 2013.
- RIBANI, M; BOTTOLI, C. B. G; COLLINS, C. H; JARDIM, I. C. S. F; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

- RIVIERE, J. E; PAPICH, M. G. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics** – 9ª edição. 2009, 1010p.
- STROFFREGEN, D. A; WOOSTER, G. A; BUSTOS, P.S; BABISH, J. G. Multiple route and dose pharmacokinetics of enrofloxacin in juvenile Atlantic salmon. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**.v. 20, p.111-123, 1997.
- SAMANIDOU, V. EVANGGELOPOULOU, E.; TRÖZZMÜLLER, M; GUO, X.; LANKMYR, E. Multi-residue determination of seven quinolones antibiotics in gilthead seabream using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography a.**, v.1203, p.115-123, 2008.
- TANG, J.; YANG, X. L; ZHENG, Z. L; YU, W. J; HU, K.; YU, H. J. Pharmacokinetics and the active metabolite of enrofloxacin in Chinese mitted-handed crab (*Eriocheir sinensis*). **Aquaculture**,n. 260, p.69-76, 2006.
- TOUTAIN, P. L; BOUSQUET-MÉLOU, A. Plasma terminal half-life. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 27, p. 427-439, 2004.
- UDOMKUSONSRI, P; ARTHITVONG, S; KLANGKAEW, N; KUSUCHARIT, N. Pharmacokinetics of enrofloxacin in Koi Carp (*Cyprinus carpio*) after various routes of administration. **Kasetsart Journal: Nature Science**. n.41, p.62-68, 2007.
- USP – Veterinary Pharmaceutical Information Monographs. **Fluoroquinolones veterinary-systemic**, p 87-108, 2003.
- VISENTAINER, J. V.; SALDANHA, T.; BRAGAGNOLO, N.; FRANCO, M.R.B. Relação entre teores de colesterol em filés de tilápias e níveis de óleo de linhaça na ração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.25, n.2, p. 310-314, 2005.
- WANG. J; MACNEIL, J. D; KAY, J. F. **Chemical analysis of antibiotic residues in food**. 1ª edição. 2012, 61-109p.
- XU, W; ZHU, X; WANG, X; DENG. L; ZHANG, G. Residues of enrofloxacin, furazolidone and their metabolites in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**. v. 254, p. 1-8, 2006.

## CONCLUSÕES GERAIS

A falta de informações relacionadas ao uso racional de antimicrobianos na aquicultura é muito grande. A área tem grande carência de estudos clínicos que deem suporte para o desenvolvimento de terapias com máxima eficácia e mínimo risco de resistência. Além disso, o não cumprimento das boas práticas de manejo e a ineficiente fiscalização tem permitido o uso indiscriminado de diversos antimicrobianos que são licenciados para outras espécies animais na aquicultura.

A qualidade dos resultados obtidos em estudos farmacocinéticos com peixes exige boa técnica analítica com instrumentos e métodos confiáveis para quantificação e excelente classificação dos animais. A uniformidade do lote é imprescindível para que todos recebam a dose correta do antimicrobiano através da ração medicada.

Neste trabalho, o uso de LC-FLD atendeu às expectativas e os métodos analíticos desenvolvidos e validados mostraram-se adequados para a identificação e quantificação dos analitos CIP e ENR em todas as matrizes estudadas.

Os métodos de preparo desenvolvidos foram relativamente simples o que colaborou para a otimização no tempo de preparo das amostras (plasma e músculo).

A técnica de revestimento polimérico na ração foi decisiva para que se pudesse usar o padrão analítico e não o medicamento contendo o fármaco para o preparo da ração medicada. Além disso, com este processo há maior homogeneidade no revestimento do que com o método usual (revestimento com óleo) garantindo que a população-alvo ingira a quantidade adequada para obtenção da concentração terapêutica da ENR. A homogeneidade da dose é fato indiscutível para a realização desses ensaios.

Apesar dos dados farmacodinâmicos para ENR (CIM) serem muito antigos, do começo da década de 90 ao obter o índice PK/PD baseado nos valores de CIM para a maioria dos patógenos, exceto para *Streptococcus* sp, a alta correlação, indica a possibilidade do seu uso terapêutico seguro em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). No entanto, não expressam a realidade, já que não há valores de CIM definidos da enrofloxacinina para bactérias de maior importância na tilapicultura brasileira.

Por último, o longo tempo de meia-vida de eliminação da ENR no músculo (2,08 dias) chama atenção para maiores intervalos de tempo necessários para o consumo

seguro do produto cárneo, com níveis de resíduos abaixo do LMR permitido ( $100 \text{ ug kg}^{-1}$  para a soma de CIP e ENR).

## **ANEXO**

### **APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA / UNESP – JABOTICABAL**





**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 016078/11 do trabalho de pesquisa intitulado "Contribuição à aquicultura brasileira pelo estudo da enrofloxacin em tilápias quanto à eficácia de uso, aspectos farmacocinéticos e depleção de resíduos", sob a responsabilidade da Profª Drª Fabiana Pilarski está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 05 de Agosto de 2011.

Jaboticabal, 10 de Agosto de 2011.

**Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui**  
Presidente - CEUA

**Med. Vet. Maria Alice de Campos**  
Secretária - CEUA