UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Luciana Pereira Lourenço

Ribeirão Preto

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado (a): Luciana Pereira Lourenço

Orientador (a): Cristiane Masetto de Gaitani

Coorientador: Jonas Augusto Rizzato Paschoal

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

Ribeirão Preto
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Lourenço, Luciana Pereira

Desenvolvimento de método analítico para determinação de fármacos veterinários por eletroforese capilar em ração para peixes. Ribeirão Preto, 2017.

71p.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos
Orientador: de Gaitani, Cristiane Masetto
Co-orientador: Paschoal, Jonas Augusto Rizzato

1. Antimicrobianos. 2. Eletroforese Capilar. Lixiviação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciana Pereira Lourenço

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

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador (a): Cristiane Masetto de Gaitani

Coorientador: Jonas Augusto Rizzato Paschoal

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais , Alfredo e Sandra, que mesmo à distância , estiveram presente em todo esse período.

Obrigada pelo carinho, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me protege, abençoa e me dá forças quando mais preciso.

Á Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani, pela orientação, pelas contribuições científicas, tempo, dedicação e compreensão.

Ao Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Pascoal, por contribuir cientificamente para conclusão deste trabalho.

Ao *Prof. Dr. Oswaldo de Freitas*, pelas contribuições com o desenvolvimento de incorporação dos fármacos na ração, bem como seu aluno *Hugo* e sua técnica *Maíra*.

Aos meus pais, Alfredo e Sandra, por sempre me incentivarem e acreditarem em minha capacidade de concluir mais esta etapa de minha vida. *Aos meus familiares*, que mesmo à distância, sempre torceram por mim.

Ao meu marido, Guilherme, pelo incentivo, amor e paciência.

A minha prima irmã, Sâmia, por sempre ter me servido de exemplo.

Aos amigos de laboratório, por compartilharem conhecimentos e momentos de descontração.

À Mariana pela infinita disposição em ajudar, pelas discussões científicas e por tornar o dia a dia no laboratório mais alegre.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo auxílio prestado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

LOURENÇO, L.P. **Development of analytical method for determination of veterinary drugs by capillary electrophoresis in fish feed.** 71f. Thesis (Doctoral) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Fish farming has been prominent at the national level, since Brazil has a significant availability of water resources and favorable geographical and climatic conditions that allow the creation of exotic and native species. Due to commercial and financial purposes, producers use the captive production system, which is an environment conducive to the spread of diseases, due to the greater population density of the animals, with the aggravating circumstance that the aquatic environment leads to the proliferation of infectious diseases. Thus, one of the technologies used to solve this problem is the use of veterinary drugs, in which antimicrobials of the quinolones and sulphonamides class. The main route of administration of these drugs is by oral ingestion through feed. The incorporation of drugs in feed is a critical aspect and of great importance when it comes to a guarantee of the dose of treatment of the animals, as well as the risks related to environmental contamination resulting from leaching of the drugs from the feed to a water. Therefore, analytical methods for the quantification of drugs in feed are essential. Given the advantage of having a versatile analytical method capable of being applied to the simultaneous determination of different drugs, the use of capillary electrophoresis constitutes a promising alternative. In this context, the aim of this study was to develop and validate a method for the analysis of six quinolones (ciprofloxacin, difloxacin, ofloxacin, oxolinic acid, flumequine and enrofloxacin) and four sulfonamides (sulfamethazine, sulfadethoxine, sulfamethoxazole and sulfathiazole) simultaneously by capillary electrophoresis. For this, a fused silica capillary of 50 cm in effective length and 75 μm internal diameter and running electrolyte composed of a sodium borate solution in the concentration of 35 mmol L-1, 15% of methanol and pH 8.5, current 60 μA, temperature of 35 ° C and detection at 255 nm. Under final conditions, all analytes were separations in less than 20 minutes. The parameters of analytical performance, linearity, precision, accuracy, limit of quantification and detection, selectivity and robustness were evaluated and are in accordance with the requirements recommended by the official guides. The method was applied to quantify the drugs in the feed after the incorporation and in the study of the leaching of the drugs. After 10 minutes of exposure in the water, there was a significant loss of CIPRO (11%) and MTZ (16%), corresponding to 1,650 mg g^{-1}/fish/day and 2,400 mg g^{-1}/fish/day, respectively. Thus, leaching has been shown to be a factor that should be considered in the treatment of animals in fish farming, since it may contribute to inefficiency of treatment, bacterial resistance and impair water quality.

Keywords: Antimicrobials, capillary electrophoresis, leaching, fish farming

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica das SF..... 5

Figura 2. Esquema representativo das etapas do processo de extração de SF e QN da ração extrusada para peixe..... 21

Figura 3. Esquema demonstrativo de incorporação dos fármacos na ração extrusada por leito fluidizado..... 27

Figura 4. Influência da porcentagem de metanol na separação dos analitos. 31

Figura 5. Influência da concentração do tampão borato de sódio na separação e tempo de migração dos analitos..... 32

Figura 6. Influência do pH do BGE no tempo de migração dos analitos..... 33

Figura 7. Eletroferograma referente às condições selecionadas para a separação de QNs e SFs por CE..... 35

Figura 8. Avaliação de diferentes solventes para extração de SF e QN em ração para peixe..... 37

Figura 9. Avaliação da estabilidade das SF e QN frente à exposição à alta temperatura (60°C)..... 39

Figura 10. Eletroferograma representando a seletividade do método..... 40

Figura 11. Teste de estabilidade em solução padrão para análise de SF e QN..... 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes variações de SF utilizadas na piscicultura..... 5

Tabela 2. Estruturas químicas, classificações e informações químicas das QN..... 7

Tabela 3. Formas de administração de antibióticos utilizados na piscicultura... 8

Tabela 4. Trabalhos descritos na literatura para quantificar os principais antimicrobianos veterinário em ração para peixes..... 13

Tabela 5. Influência do pH do BGE na resolução dos analitos..... 33

Tabela 6. Influência da corrente na resolução dos analitos..... 34

Tabela 7. Condições eletroforéticas selecionadas para a separação das QN e SF..... 35

Tabela 8. Parâmetros de linearidade do método para análise das SF e QN..... 41

Tabela 9. Repetibilidade e Precisão Intermediária do método para análise das SF e QN..... 43

Tabela 10. Veracidade/Exatidão do método para análise das SF e QN..... 45

Tabela 11. LQ do método para análise das SF e QN..... 46

Tabela 12. Rendimento do processo de incorporação dos fármacos na ração..... 49

Tabela 13. Estudo de lixiviação das SF e QN na ração para peixe..... 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	Acetona
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
ACN	Acetonitrila
BGE	Eletrólito de corrida
CE	Eletroforese capilar
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detector por arranjo de diodos
EOF	Fluxo eletrosmótico
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
GC	Cromatografia gasosa
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial
LMR	Limite Máximo de Resíduos
MAPA	Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
NaOH	Hidróxido de sódio
PAMVET	Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos
PI	Padrão interno
r	Coeficente de correlação
Rec	Recuperação
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

RESUMO ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
LISTA DE FIGURAS ..... **iii**
LISTA DE TABELAS ..... **iv**
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ..... **v**

1. INTRODUÇÃO ..... **8~~1~~**
1.1 Antimicrobianos de uso animal ..... 10~~3~~
1.1.1 Sulfonamidas ..... 11~~4~~
1.1.2 Quinolonas ..... 12~~6~~
1.2 Formas de administração dos antimicrobianos na piscicultura ..... 14~~7~~
1.3 Consequências da administração de fármacos via oral na piscicultura ..... 17~~10~~
1.4 Legislação vigente sobre o uso de antimicrobianos na piscicultura ..... 18~~11~~
1.5 Métodos analíticos para determinação de antimicrobianos em ração utilizados na piscicultura ..... 18~~11~~
2. OBJETIVOS ..... **23~~1~~6**
2.1 Objetivo Geral ..... 23~~1~~6
2.2 Objetivos específicos ..... 23~~1~~6
3. MATERIAL E MÉTODOS ..... **25~~1~~8**
3.1 – Substâncias Químicas e Reagentes ..... 25~~1~~8
3.2 – Equipamentos ..... 25~~1~~8
3.3 - Capilar e condicionamento ..... 26~~1~~9
3.4 - Soluções padrão ..... 26~~1~~9
3.5 - Seleção das condições de análise ..... 26~~1~~9
3.6 - Amostra da ração 20
3.7 – Extração 20
3.8 - Validação do método ..... 29~~2~~2
3.8.1 Seletividade ..... 29~~2~~2
3.8.2 Linearidade ..... 29~~2~~3

3.8.3 Precisão ..... 30~~2~~3
3.8.4 Veracidade/Recuperação ..... 30~~2~~4
3.8.5 Limite de Quantificação (LQ) ..... **Erro! Indicador não definido.**~~24~~
3.8.6. Estabilidade ..... 31~~2~~5
3.9 Aplicação do método ..... 31~~2~~5
3.9.1 Incorporação dos fármacos na ração ..... 31~~2~~5
3.9.2 Estudo de lixiviação ..... 33~~2~~7
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 34~~29~~
4.1 Método analítico para separação das SF e QN por CE-DAD ..... 34~~29~~
4.1.1 Escolha do BGE ..... 34~~29~~
4.1.2 Solvente orgânico ..... 35~~30~~
4.1.3 Concentração e pH do BGE ..... 36~~31~~
4.1.4 Corrente ..... 38~~33~~
4.1.5 Temperatura ..... 39~~34~~
4.1.6 Condições de separação selecionadas ..... 39~~35~~
4.2 Extração ..... 40~~36~~
4.2.1 Escolha do solvente extrator ..... 41~~36~~
4.2.2 Estabilidade dos analitos em alta temperatura ..... 43~~38~~
4.3 Validação do método ..... 45~~40~~
4.3.1 Seletividade ..... 45~~40~~
4.3.2 Linearidade ..... 46~~41~~
4.3.3. Precisão ..... 48~~42~~
4.3.4 Veracidade/Recuperação ..... 50~~44~~
4.3.5 Limite de quantificação (LQ) ..... **Erro! Indicador não definido.**~~4~~6
4.3.6 Estabilidade ..... 52~~46~~
4.4 Aplicação do método ..... 53~~4~~7
4.4.1 Incorporação dos fármacos na ração ..... 53~~4~~7
4.4.2 Estudo do perfil de lixiviação ..... 54~~49~~
5. CONCLUSÃO ..... 57~~52~~
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... Erro! Indicador não definido.**~~54~~**

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1 Antimicrobianos de uso animal

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

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

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

1.1.1 Sulfonamidas

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

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

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

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

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

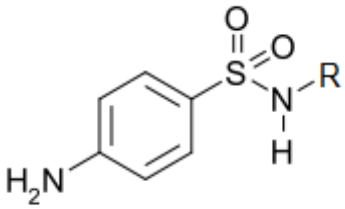
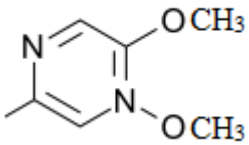
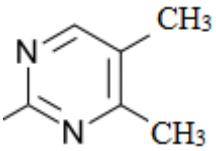
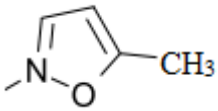
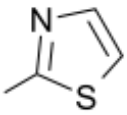


Figura 1. Estrutura básica das SF

Tabela 1. Diferentes variações de SF utilizadas na piscicultura.

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

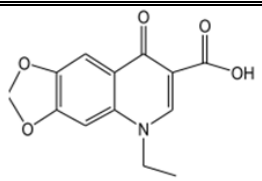
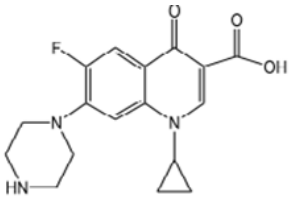
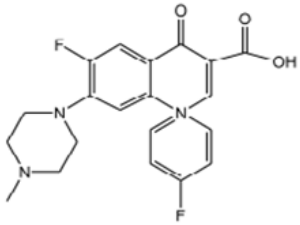
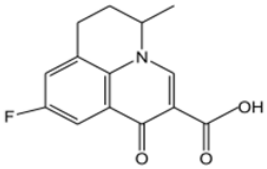
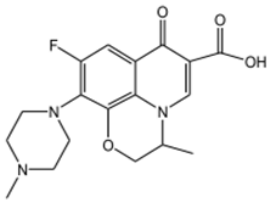
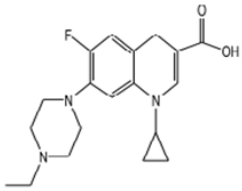
1.1.2. Quinolonas

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

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

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

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

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

1.2 Formas de administração dos antimicrobianos na piscicultura

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

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

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

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

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

i) *Ração farelada*: os ingredientes da ração são apenas moídos e misturados, recebendo a adição do(s) fármaco(s) de interesse(s). Sua utilização não é recomendada, uma vez que as perdas de nutrientes e do(s) fármaco(s) adicionados são muito grandes, causando não só problemas aos peixes, como a poluição da água dos tanques;

ii) *Ração peletizada*: as partículas menores dos ingredientes são aglomeradas através da combinação de umidade, calor e pressão, dando origem aos péletes. A adição do fármaco ocorre antes do processo de peletização. A estabilidade dos péletes na superfície da água é comprometida, pois ela imerge rapidamente na água;

iii) *Ração extrusada*: consiste num processo de cozimento em alta temperatura, com pressão e umidade controladas. Esse processo provoca a gelatinização do amido e o pélete sai do extrusor parcialmente expandido, permitindo que a ração fique na superfície da água (boiando), o que facilita a observação do consumo pelos peixes. O fármaco é adicionado antes do processo de extrusão da ração, de modo que a sua estabilidade deve ser considerada antes aos fatores físicos de temperatura e pressão envolvidos no processo de obtenção da ração.

iv) *Ração aspergida*: consiste no processo de adição do fármaco à ração por aspersão, que consiste na mistura do(s) fármaco(s) em óleo (ou outro material de revestimento), para posterior pulverização dos péletes extrusados de ração. A mistura do fármaco com o óleo mineral visa dificultar a rápida solubilidade do fármaco na água. Atualmente, esta tem sido a forma de adição do fármaco à ração mais empregada na piscicultura (RIBEIRO et al., 2012).

1.3 Administração de fármacos via oral na piscicultura

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

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

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

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

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

1.4 Legislação vigente sobre o uso de antimicrobianos na piscicultura

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método multiclasse para a determinação simultânea de dez antimicrobianos: (Ciprofloxacino (CIPRO), Enrofloxacino (ENRO), Difloxacino (DIFLO), Flumequina (FLU), Ácido Oxolínico (OXO), Ofloxacino (OFLO), Sulfametazina (MTZ), Sulfadimetoxina (DMX), Sulfametoxazol (MXL) e Sulfatiazol (TZL)) empregando a CE e aplicação em estudo de avaliação do perfil de lixiviação desses fármacos depois de incorporados a ração usada na piscicultura.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar as condições eletroforéticas para análise de dez antimicrobianos de interesse por CE
- ✓ Desenvolver um método para extração dos fármacos anteriormente descritos em ração para peixes
- ✓ Validar o método analítico desenvolvido de acordo com os parâmetros estabelecidos com normativas vigentes no MAPA
- ✓ Desenvolver um procedimento para incorporar os fármacos na ração
- ✓ Aplicar o método analítico no estudo do perfil de lixiviação dos fármacos

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Substâncias Químicas e Reagentes

DANO, CIPRO, ENRO, DIFLO, FLU, NALI, OXO, MTZ, DMX, MXL e TZL foram adquiridos da Sigma-Aldrich, EUA (≥99,0%).

Para o preparo da solução de eletrólito de corrida (BGE,) foi utilizado o reagente (grau analítico) borato de sódio (JTBaker, Itália), Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) (JT Baker, EUA) e fosfato de sódio (Merck, Alemanha). O metanol (grau HPLC) utilizado no preparo das soluções padrões foi obtido da JTBaker (México). O hidróxido de sódio foi adquirido da Nuclear (Brasil) e ácido clorídrico foi obtido da Zilquímica (Brasil). Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico e do mais alto grau de pureza disponível.

As soluções foram filtradas em filtro Millex – HV com poros de 0,45 µm, obtidos da Millipore (EUA) e levadas ao ultrassom, a fim de eliminar os gases dissolvidos nas mesmas.

3.2 – Equipamentos

As análises foram realizadas em um sistema de CE Beckman Coulter (EUA), modelo P/ACE MDQ que consiste em um analisador, um amostrador automático e um detector por arranjo de diodo operando em 255 nm. O Software 32 Karat foi usado para aquisição de dados.

Os componentes empregados no preparo das soluções padrão foram pesados em balança analítica Sartorius, modelo CPA225D (Alemanha). O peagômetro modelo PHS-3Bda PHTEK (Brasil) foi empregado para medir o pH das soluções aquosas. Para eliminar os gases dissolvidos na solução, foi utilizado um sistema de ultrassom Ultrasonic Cleaner modelo 03350 (Brasil). Foi utilizado também um Concentrador de amostras CentriVap (Labconco corporation, Kansas, EUA) e um agitador de tubos Phoenix modelo AP56 (Brasil). A água utilizada para o prepararo das soluções foi obtida do sistema Direct-Q 3 da Millipore (EUA).

3.3 - Capilar e condicionamento

Um capilar de sílica fundida de 61 cm de comprimento total e 50,0 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno (d.i.), obtido da Microsolv (EUA) foi empregado na realização dos experimentos. O capilar normalmente é recoberto por uma camada de poliimida que o torna flexível. Assim, para que a detecção ocorra *on column* é necessário remover esta camada de poliimida na região de detecção (janela óptica), e isto foi feito aquecendo uma pequena região (0,5 cm), aproximadamente 11 cm antes do final do capilar.

Antes da primeira utilização, o capilar foi condicionado por lavagem com solução de NaOH 1,0 mol L^{-1} por 30 min, em seguida com água por 30 min a 25 °C. No início de cada dia de trabalho, o capilar foi lavado com solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} por 15 min e depois com água por 15 min. Entre as análises o capilar foi lavado com solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} por 1,5 min, água por 1,5 min e eletrólito de corrida por 2,0 min. Após o uso diário, o capilar foi lavado com solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} por 15 min e depois com água por 15 min. O capilar foi armazenado em água quando não estava em uso.

3.4 - Soluções padrão

A solução estoque (1000 µg g^{-1}) e soluções de trabalho (10 µg g^{-1}) de cada fármaco foram preparadas em metanol. A solução de trabalho consistia em um *mix* de todos os analitos e foram preparadas a partir de cada solução estoque. Para o preparo das soluções de FLU, ENRO e OXO foi necessário adicionar 1 mL de ácido acético 1 % para sua completa solubilização. A solução estoque e de trabalho de NALI (1000 µg g^{-1} e 20 µg g^{-1}, respectivmente), utilizada como padrão interno, foram preparadas em metanol. As soluções foram armazenadas a - 20 °C e protegidas da luz.

3.5 - Seleção das condições de análise

Cinquenta microlitros da solução-padrão na concentração de 10 µg mL^{-1}de cada analito foram transferidos para um tubo cônico âmbar e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos foram dissolvidos em 150 µL de BGE e os tubos foram agitados em *mixer* por 20 s. Esta solução foi então transferida para os *vials* de injeção e realizada a análise eletroforética.

Para obter as condições de análise, alguns parâmentros foram avaliados:

- BGE:

  - Tipo: Borato de sódio, fosfato de sódio e TRIS

  - Concentração: 35, 40, 45 e 50 mmol L^{-1}

  - pH: 8.0, 8.3, 8.5, 8.7

  - Porcentagem de metanol: 1, 5, 10, 15 e 20%.
- Temperatura: 15, 20, 25, 30 e 35°C.
- Corrente: 40, 50, 60, 70, 80 µA.

3.6 - Amostra da ração

A ração utilizada para os ensaios de lixiviação e para o estudo de incorporação foi da marca Purina (SI CRESCIMENTO® contendo 28% de proteína), extrusada e de diâmetros na faixa de 4 a 6 mm.

3.7 – Extração

O procedimento de preparo de amostra baseou-se no método de extração sólido-líquido, em que o analito de interesse é extraído da matriz sólida para um solvente líquido extrator.

Inicialmente, o protocolo de extração foi realizado no trabalho de REZENDE (2012), com modificações, seguindo o fluxograma demostrado na Figura 2.

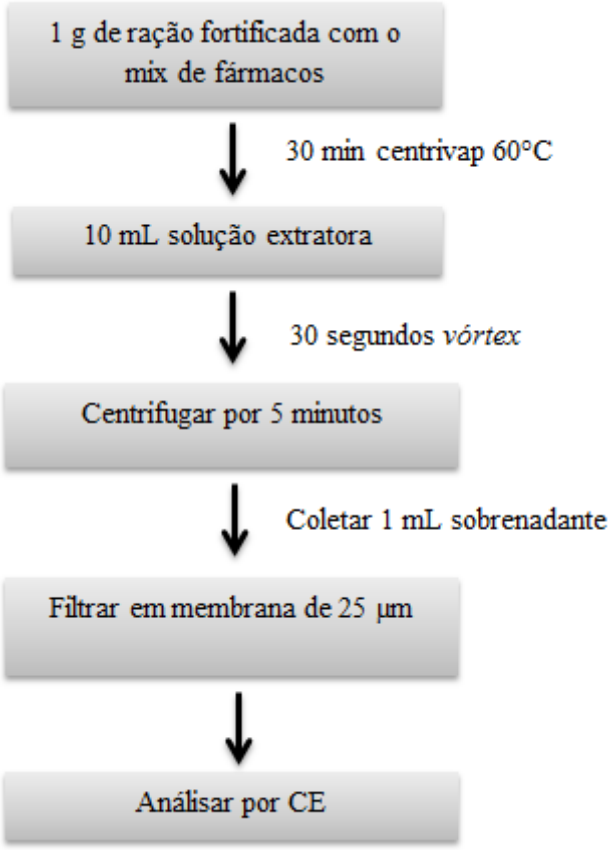


Figura 2. Procedimento de extração de SF e QN da ração extrusada para peixe (REZENDE, 2012).

Um grama de ração foi previamente pesado e triturado com auxílio de grau de porcelana e pistilo. A ração foi fortificada com todos os fármacos de interesse nas concentrações de 500 µg g^{-1} (ENRO, CIPRO, DIFLO, DANO, OFLO, MTZ e TZL), 750 µg g^{-1} (MTX e DMTX) e 1500 µg g^{-1} (FLU). Em seguida, a ração fortificada passou pelo processo de secagem a 60°C por 30 minutos. Foram adicionados 10 mL da solução extratora (solvente orgânico:ácido fórmico 1%, v/v) e agitados em *vórtex* por 30 segundos. A solução foi centrifugada por 5 minutos à 5°C e 2300 *g*, e 1 mL do sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana de celulose 0,25 µm. Cinquenta microlitros dessa solução foram transferidos para um tubo de vidro cônico e o solvente foi evaporado com auxilio de ar comprimido. O resíduo foi dissolvido em 150 µL de BGE diluído (1:10, v/v) e analisado por CE.

3.8 - Validação do método

De acordo com o MAPA (2011) a validação de determinado procedimento analítico objetiva demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação preconizados. Trata-se de um estudo experimental e integralmente documentado. De modo geral, a validação visa garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões.

Sendo assim, o procedimento de validação de métodos deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis (PASCHOAL, 2008), sendo que os parâmetros analíticos de validação mais usados para avaliar métodos de separação são: seletividade, estabilidade em diferentes tempos de estocagem, efeito matriz, linearidade, precisão, veracidade, limite de detecção e robustez.

Esses parâmetros, e os que foram avaliados no presente trabalho, foram baseados nos parâmetros estabelecidos pelo Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica (MAPA, 2011) e complementados com o Manual de Garantia de Qualidade Analítica (MAPA, 2011) e Guia para validação de métodos analíticos (ANVISA, 2003).

3.8.1 Seletividade

A avaliação deste parâmetro foi realizada a partir da comparação entre os sinais (resposta instrumental) advindos do processamento da matriz (amostra branco) com amostra fortificada com as QN e SF em concentrações correspondentes às suas respectivas curvas analíticas. Esses testes foram realizados em quintuplicatas e avaliada a presença de algum interferente que pudesse comprometer a quantificação dos analitos de interesse.

3.8.2 Linearidade

Para a construção da curva de calibração analítica, foram usados 6 níveis de concentração, de todos os analitos, em triplicata. Para isso, a ração triturada (500 mg) foi enriquecida com solução padrão na concentração de 500 µg g^{-1} (ENRO, CIPRO, DIFLO, DANO, OFLO, MTZ e TZL), 750 µg g^{-1} (MTX e DMTX) e 1500 µg g^{-1} (FLU) e 1000 µg g^{-1} de padrão interno (PI) obtendo-se concentrações finais de 10, 15, 20, 25, 30, 35 µg g^{-1} de ração dos analitos de interesse e 20 µg g^{-1} de ração do PI. Em seguida, essas amostras foram submetidas ao processo de extração descrito na Figura 2.

As curvas de calibração analíticas foram traçadas plotando-se a razão da área dos picos de cada analito e PI no eixo das ordenadas (eixo y) e as concentrações no eixo das abcissas (eixo x). Os dados foram calculados empregando a soma dos mínimos quadrados e o coeficiente de correlação foi obtido. A validade da regressão foi confirmada aplicando o teste da falta de ajuste linear (*lack of fit test*).

3.8.3 Precisão

Precisão é a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As duas formas de expressá-la são através da repetibilidade e da precisão intermediária. A repetibilidade corresponde ao grau de concordância dos resultados de medições sucessivas, entre uma corrida e outra, chamada também por precisão intracorrida. Já a precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sob as mesmas condições, mas alterando alguma condição, tais como: mudar o analista, mudar equipamento, em diferentes laboratórios (MAPA, 2011)

Assim, a repetibilidade foi realizada em três níveis de concentrações, onde a matriz branca foi fortificada em três níveis de concentração correspondentes a 10, 25 e 35 µg g^{-1} de ração, em sextuplicata e avaliada através do coeficiente de variação (CV, %), que é calculado conforme a **equação 1:**

Equação 1 $$\boldsymbol{CV}(\%) = \frac{\boldsymbol{desvio\ padrão}}{\textbf{Média}}$$

A precisão intermediária foi realizada em dois dias diferentes nas mesmas condições citadas anteriormente.

3.8.4 Veracidade/Recuperação

A veracidade é a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro. A veracidade está inversamente relacionada ao erro sistemático ou a correção ou ao fator de correção e é realizada por ensaios de recuperação (MAPA, 2011).

Para avaliar a recuperação, foram preparadas amostras fortificadas em três níveis de concentração, 10, 25 e 35 µg g^{-1} de ração, em seis réplicas. As respostas foram avaliadas através do fator de recuperação (f_{rec}), onde C_f é a concentração obtida após a

fortificação da matriz branca, C_{nf} é a concentração obtida da matriz não fortificada e C_{ad} é a concentração do analito em solução padrão, de acordo com a **equação 2:**

Equação 2 $$f\ \text{rec}\ (\%) = \frac{Cf - Cnf}{Cad}\ \text{X}\ 100$$

3.8.6. Estabilidade

Seguindo o recomendado pelo guia do MAPA, 2011, a estabilidade foi avaliada através da comparação das amostras contendo as SF e QN em solução metanólica recém-preparadas e soluções que estavam armazenadas em refrigerador -20°C e protegidas da luz há seis e doze meses, na concentração de 25 µg g^{-1}.

3.9 Aplicação do método

3.9.1 Incorporação dos fármacos na ração

A principal via de administração de medicação na piscicultura é a via oral, através da ração. Levando em consideração que os fármacos a serem estudados não se encontram disponíveis na forma de medicamentos prescritos para peixes, e não havendo um procedimento padrão definido para adição dos fármacos na ração, foi necessária uma avaliação mais detalhada no método de incorporação dos fármacos na ração. Para realizar este estudo, foram utilizados os fármacos CIPRO, ENRO, MTZ, DMTX e MTX.

A incorporação dos fármacos à ração foi feita utilizando uma solução etanólica contendo os fármacos solubilizados e péletes de ração. Foram adicionadas doses correspondentes a 500 µg g^{-1} (CIPRO, ENRO e MTZ) e 750 µg g^{-1} (DMTX e MTX) de ração. A fim de evitar possíveis perdas, foram adicionados 20 % a mais de cada fármaco que a dose recomendada. Os fármacos foram adicionados à ração por três diferentes métodos: homogeneização manual, pulverização e leito fluidizado.

i) Homogeneização manual: foram adicionados 10 g da ração extrusada em um béquer de vidro. Em seguida, as soluções contendo os fármacos de interesse foram vertidas no béquer, e a agitação se realizou com o auxílio de um agitador mecânico, por 5 minutos.

ii) Pulverização: 80 g da ração extrusada foram adicionadas em uma peneira. A solução contendo os fármacos de interesse foi adicionada em um compressor pulverizador elétrico. Em seguida, os fármacos foram pulverizados sobre a ração a uma vazão constante.

iii) Leito Fluidizado: 80 g da ração extrusada foram adicionadas no leito fluidizado. Em seguida, a solução contendo os fármacos de interesse foi pulverizada mecanicamente na ração, na vazão constante de 2,0 mL min^{-1}. Simultaneamente, a solução foi evaporada com o auxílio do fluxo de ar aquecido, na temperatuda de 45 °C. A Figura 3 representa a incorporação dos fármacos por leito fluidizado.

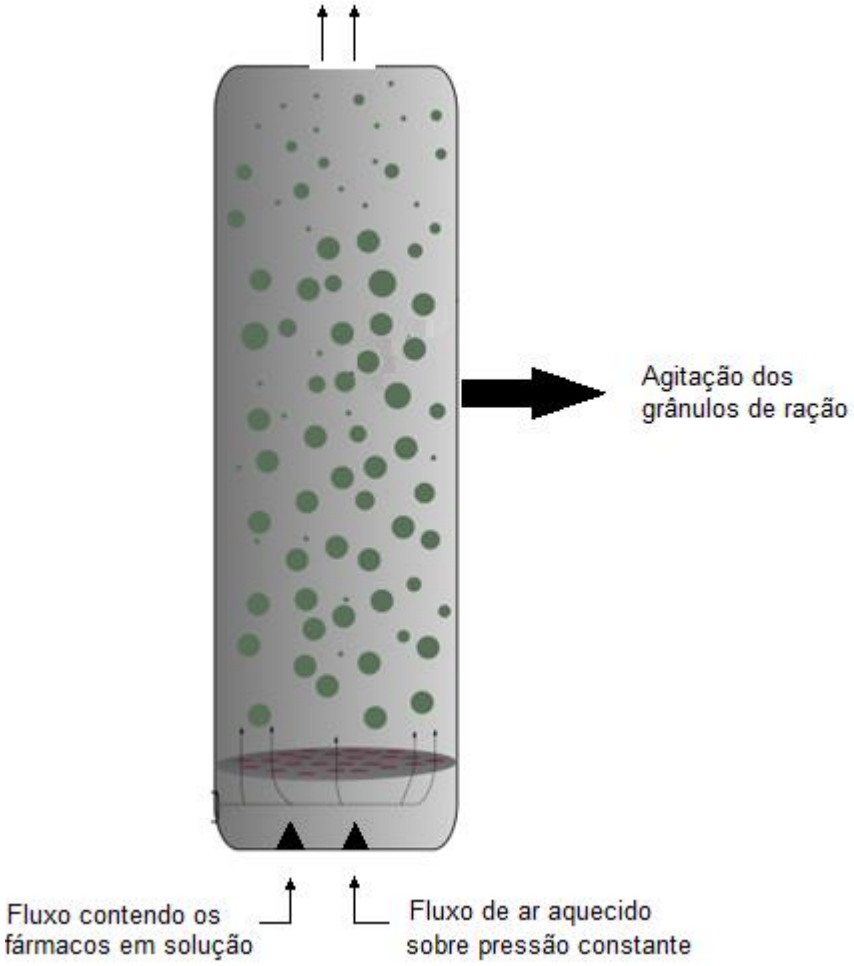


Figura 3. Esquema demonstrativo de incorporação dos fármacos na ração extrusada por leito fluidizado (figura adaptada disponível em https://pt.wikipedia.org/wiki/Leito_fluidizado).

3.9.2 Estudo de lixiviação

A possível perda do fármaco incorporado na ração pelo processo de lixiviação na água foi avaliada segundo método descrito por REZENDE (2012). Para isso, foi pesado 1 g de ração incorporada com os fármacos (equivalente a seis péletes). Esses péletes foram acondicionados em um tecido com malha de 1 mm, fechados com elásticos e individualmente submersos em béqueres de vidro contendo 50 mL de água ultrapura, nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos. Após os determinados tempos, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente para redução da umidade. Em seguida, 1 g de ração foi submetida ao processo de extração, de acordo com o item 3.9, e os fármacos foram quantificados por CE-DAD.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Método analítico para separação das SF e QN por CE-DAD

4.1.1 - Escolha do BGE

A primeira etapa para avaliar e definir as condições analíticas de um método em CE é a escolha do BGE. Para isso, devem ser avaliadas as características físico-químicas dos analitos, bem como, sua estrutura química e sua constante de dissociação (Tabela 1 e 2) (ALTRIA, 1996). Além disso, a escolha correta da solução de eletrólitos é muito importante porque esta deve apresentar a capacidade de manter o pH constante durante toda a análise, uma vez que o fluxo eletrosmótico (EOF, *eletrosmotic flow*) e a mobilidade eletroforética são sensíveis à variação de pH (WEINBERGER, 2000).

Os BGEs avaliados foram fosfato de sódio, borato de sódio e TRIS. Nesta estapa do estudo, foram analisados nove analitos: DANO, CIPRO, OFLO, ENRO, DIFLO, MTZ, DTX, NALI e MXL. A solução tampão fosfato de sódio e a solução tampão TRIS foram testadas na concentração de 50 mmol L^{-1} pH 4,0 e 8,3, respectivamente (30 °C e 15 kV). Nessas condições, não foi observada a migração dos picos correspondentes aos analitos de interesse. A solução tampão borato de sódio foi analisada na mesma condição (50 mmol L^{-1} pH 8,3, 30 °C e 15 kV) e, neste caso, ocorreu a separação dos analitos de interesse na linha de base.

Um dos fatores para escolha de uma solução tampão é a sua força iônica. A literatura recomenda realizar corridas abaixo de 100 µA, pois acima deste valor, a parede do capilar pode ser danificada, além de afetar a forma dos picos (ALTRIA, 2007). O tampão borato de sódio apresenta íons volumosos e de baixa mobilidade o que permite empregá-los em concentrações altas, sem gerar calor excessivo (MENDONÇA, 2005). Portanto, o BGE selecionado para as demais análises foi composto por tampão borato de sódio. Além disso, os principais trabalhos descritos na literatura para separação de QN e SF utilizaram solução tampão borato de sódio, como é o caso de Rusu, et al., 2014, que utilizaram este BGE (25 mmol L^{-1} pH 9,3) para separação de treze QN e no trabalho de Sun, H, Qi, H, Li, H, 2013, que utilizaram tampão borato de sódio (15 mmol L^{-1} pH 6.74) para separação de quatro SF.

4.1.2 – Solvente orgânico

O uso de solvente orgânico é comum em CE e é usado para diferentes objetivos, tais como alterar a solubilidade dos analitos investigados, controlar o EOF e proporcionar melhora na seletividade dos analitos (TAVARES, 2001; LANDERS, 2007).

O solvente empregado para estudar a seletividade dos analitos de interesse foi o metanol, pois é o mais comum a ser utilizado nesses tipos de análises e o menos agressivo ecologicamente em relação aos demais solventes orgânicos, além de diminuir o EOF devido ao aumento na viscosidade do BGE (WEINBERGER, 2000). Portanto, foi adicionado metanol no BGE nas porcentagens de 1, 5, 10, 15 e 20% (v/v). A partir dessa etapa, as análises foram estudadas com doze antimicrobianos de interesse, sendo eles: DANO, CIPRO, OFLO, ENRO, DIFLO, FLU, OXO, MTZ, DTX, NALI, MXL e TZL.

Como pode ser observado na Figura 4, o aumento na porcentagem de metanol não influenciou significativamente no tempo de migração. Por outro lado, a separação de todos os analitos de interesse ocorreu somente a partir da adição de 15% de metanol, sendo que em quantidades menores houve a co-migração de OXO, FLU, NALI e MXL (5% de metanol) e FLU, NALI, MXL e TZL (10% de metanol). Como houve pouca diferença na influência da porcentagem de metanol tanto no tempo de migração quanto na resolução a partir de 15% de metanol, este valor foi selecionado para análises posteriores.

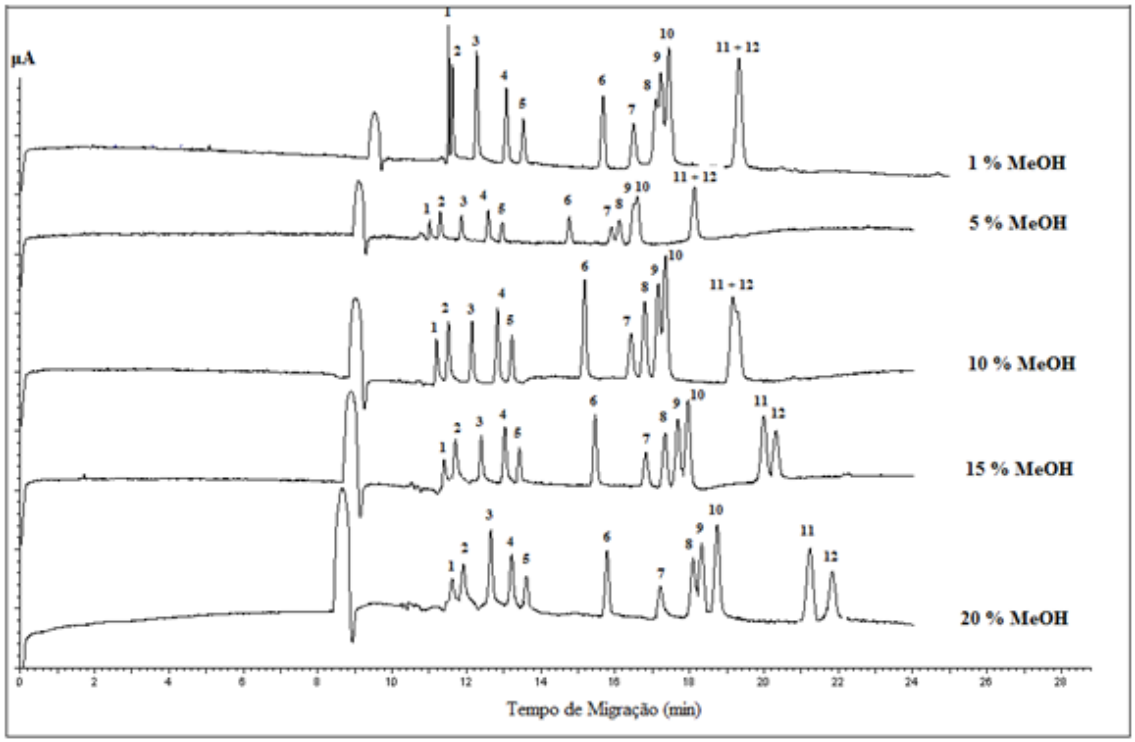


Figura 4. Influência da porcentagem de metanol na separação dos analitos. 1-DANO, 2-CIPRO, 3-OFLO, 4-ENRO, 5-DIFLO, 6-MTZ, 7-DMX, 8-OXO, 9-FLU, 10-NALI, 11-MTXZ, 12-TZL. Condições eletroforéticas: capilar de sílica de 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, BGE borato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 8,5, 80 µA, 30°C, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 0,5 psi.

4.1.3 - Concentração e pH do BGE

A fim de investigar a influência da concentração do BGE, foi avaliada solução tampão borato de sódio nas concentrações de 35, 40, 45 e 50 mmol L^{-1}. Pode ser observado, pelos resultados apresentados na Figura 5, que o aumento gradual na concentração do BGE aumentou o tempo de migração. Este resultado era esperado, pois o aumento na concentração do BGE proporciona aumento na viscosidade do meio, reduzindo a mobilidade dos analitos. Além disso, o aumento na concentração de BGE proporciona aumento na força iônica do meio e redução do potencial zeta na parede do capilar, ocasionando diminuição do EOF (JIMIDAR, 2008; WEINBERGER, 2000). Como consequência, o aumento na concentração do BGE levou ao aumento na resolução dos analitos. Portanto, foi selecionada a concentração de 40 mmol L^{-1} para as análises posteriores.

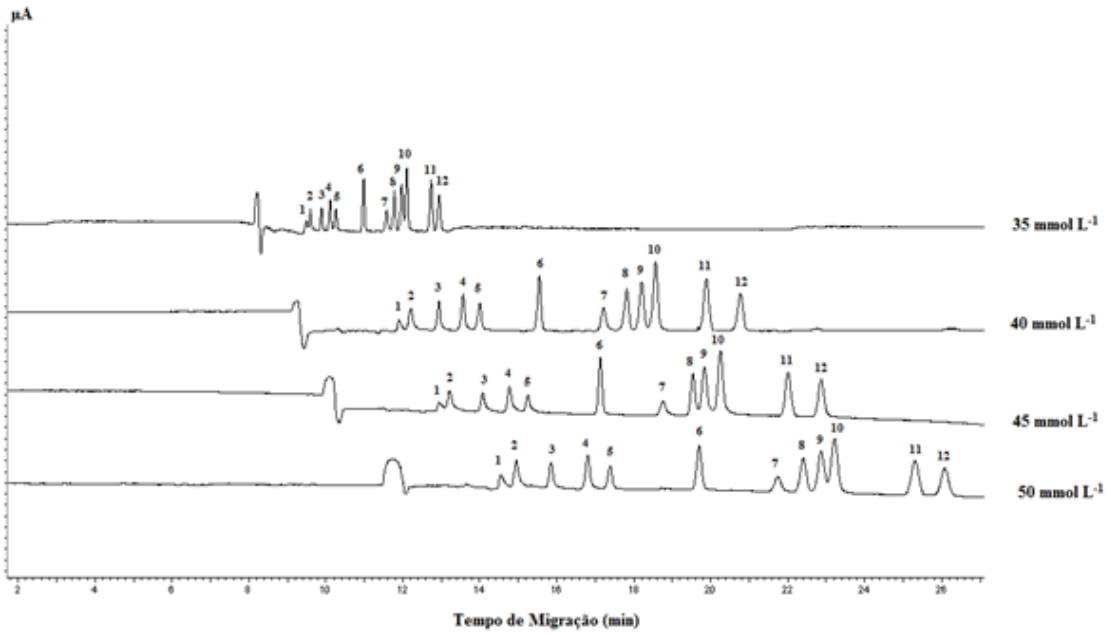


Figura 5. Influência da concentração do tampão borato de sódio na separação e tempo de migração dos analitos. 1-DANO, 2-CIPRO, 3-OFLO, 4-ENRO, 5-DIFLO, 6-MTZ, 7-DMX, 8-OXO, 9-FLU, 10-NALI, 11- MXL, 12-TZL. Condições eletroforéticas: capilar de sílica de 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, BGE borato de sódio, 15% de metanol, pH 8,5, 80 µA, 30°C, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 0,5 psi.

A escolha correta do pH do eletrólito de corrida deve ser cuidadosa, pois pode influenciar tanto o EOF quanto a mobilidade dos analitos pela alteração da carga dos mesmos (RIZZI, 2001). Como citado no item 4.1, foi decidido usar pH alcalino para as análises. Nesta condição, todos os analitos apresentam-se carregados negativamente, exceto a CIPRO, que se encontra na forma zwitteriônica. Como as análises foram realizadas no modo de polaridade normal, espera-se que os analitos migrem em direção ao detector com a mobilidade do EOF, que em pH alcalino encontra-se bastante expressivo. Assim, foi avaliada a faixa de pH de 8,0 – 8,7. Nas análises realizadas em pH 8,0 não foi possível separar todos os analitos. A Figura 6 mostra que o aumento do pH do BGE proporcionou pequeno aumento no tempo de migração dos analitos e também na resolução (Tabela 5). Isso pode ter acontecido provavelmente devido ao pH afetar o grau de ionização dos analitos, causando uma atração eletrostática destes (carga negativa) para o cátodo (carga positiva), resultando na diminuição de sua mobilidade (BONATO, JABOR e GAITANI 2005). Neste sentido, o pH 8,5 foi escolhido para as demais análises.

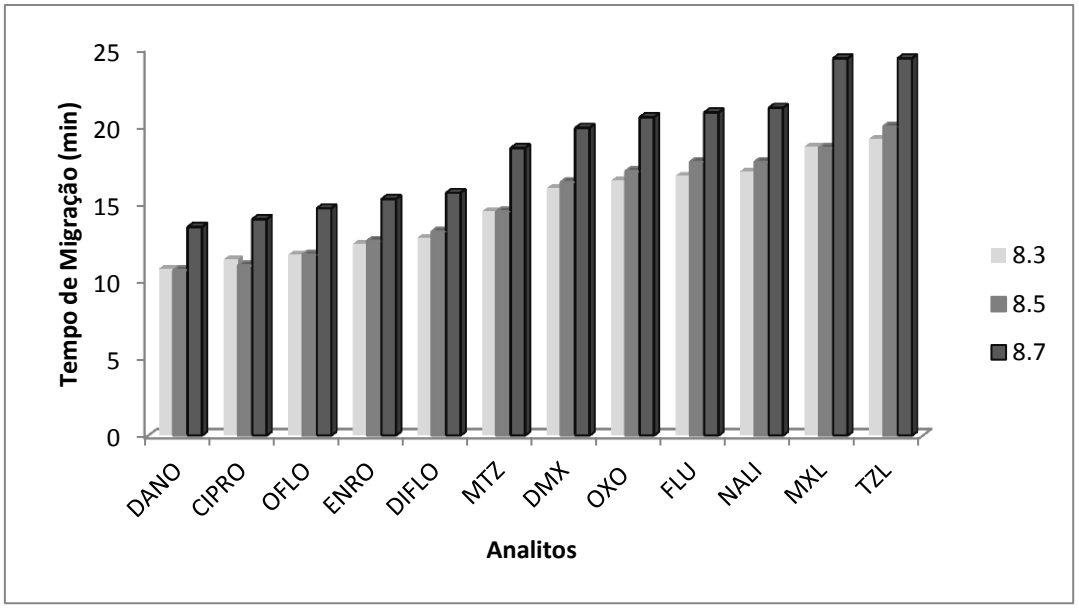


Figura 6. Influência do pH do BGE no tempo de migração dos analitos. Condições eletroforéticas: capilar de sílica de 75 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, BGE borato de sódio 40 mmol L^{-1}, 15% de metanol, 80 µA, 30°C, injeção hidrodinâmica por 10 segundos a 0,5 psi.

4.1.4 Corrente

A influência da corrente gerada após aplicação da tensão foi avaliada na faixa de 40 – 80 µA. O aumento gradual na corrente proporcionou diminuição no tempo de migração. A velocidade de migração dos íons na solução é altamente influenciada pelo campo elétrico gerado através do capilar, que por sua vez é resultante da corrente gerada. Uma vez que as velocidades de migração dos analitos e do EOF são diretamente proporcionais à corrente, quando há o aumento da tensão, há diminuição do tempo de migração (KUHN; HOFFSETTER-KUHN, 1993). Em relação à separação, a resolução está diretamente relacionada à mobilidade dos analitos (WEINBERGER, 2000). Assim, a variação da corrente, ocasionada pela aplicação da tensão, influenciou significativamente a separação de alguns analitos, como por exemplo, DANO/CIPRO, DIFLO/MTZ, MTZ/DMX, NALI/MXL e MXL/TZL, como mostra a Tabela 6. Já em alguns casos, o aumento na corrente não influenciou na separação, como por exemplo, OFLO/ENRO, ENRO/DIFLO e DMX/OXO. Assim, a corrente selecionada para as análises foi de 60 µA, sendo que nessa condição foi gerada uma tensão de 12 kV.

Tabela 6. Influência da corrente na resolução dos analitos

Corrente	Resolução dos analitos*										
	1/2	**2/3**	**3/4**	**4/5**	**5/6**	**6/7**	**7/8**	**8/9**	**9/10**	**10/11**	**11/12**
40 µA	2.1	3.5	4.7	2.8	6.0	7.9	1.3	2.2	1.0	3.9	2.5
50 µA	2.4	3.0	4.9	2.9	8.9	7.7	1.4	2.4	1.1	3.9	2.8
60 µA	2.7	2.1	4.7	2.8	8.2	8.6	1.4	2.3	1.1	3.6	3.0
70 µA	2.9	1.4	4.6	2.8	7.9	8.8	1.5	2.4	1.2	3.3	3.2
80 µA	2.8	1.1	4.1	2.6	7.4	8.4	1.5	2.3	1.2	3.1	3.1

*Analitos: 1-DANO, 2-CIPRO, 3-OFLO, 4-ENRO, 5-DIFLO, 6-MTZ, 7-DMX, 8-OXO, 9-FLU, 10-NALI, 11-MXL, 12-TZL.

4.1.5 Temperatura

O controle eficiente de temperatura é necessário em CE, pois ela influencia na repetibilidade da área dos picos e no tempo de migração (JIMIDAR, 2008). Para otimizar este parâmetro, a temperatura foi avaliada na faixa de 15 a 35°C. Com o aumento da temperatura, o tempo de migração dos analitos diminuiu. Isso normalmente ocorre, uma vez que o aumento da temperatura diminui a viscosidade do meio, proporcionando um aumento na mobilidade dos analitos (ALTRIA, 1996). Como a resolução está diretamente relacionada com a velocidade de migração dos analitos, o aumento na mobilidade dos analitos resulta em uma diminuição na sua separação (WEINBERGER, 2000, GIEND, 2008). Portanto, a temperatura selecionada para as análises foi de 35°C.

4.1.6 Condições de separação selecionadas

Após a avaliação de todos os parâmetros, a condição que proporcionou a separação das oito QN e quatro SF simultaneamente está descrita na Tabela 7 e a Figura 7 representa a separação.

Tabela 7. Condições eletroforéticas selecionadas para a separação das QN e SF

Parâmetro	Condição otimizada
Capilar	Sílica fundida 61cm de comprimento total 50cm de comprimento efetivo
BGE	Tampão borato de sódio 40 mmol L^{-1}
pH	8,5
Solvente Orgânico	15 % MeOH
Corrente	60 µA
Temperatura	35°C
Detecção	255 nm
Injeção	Hidrodinâmica 0,5 psi, 15 segundos

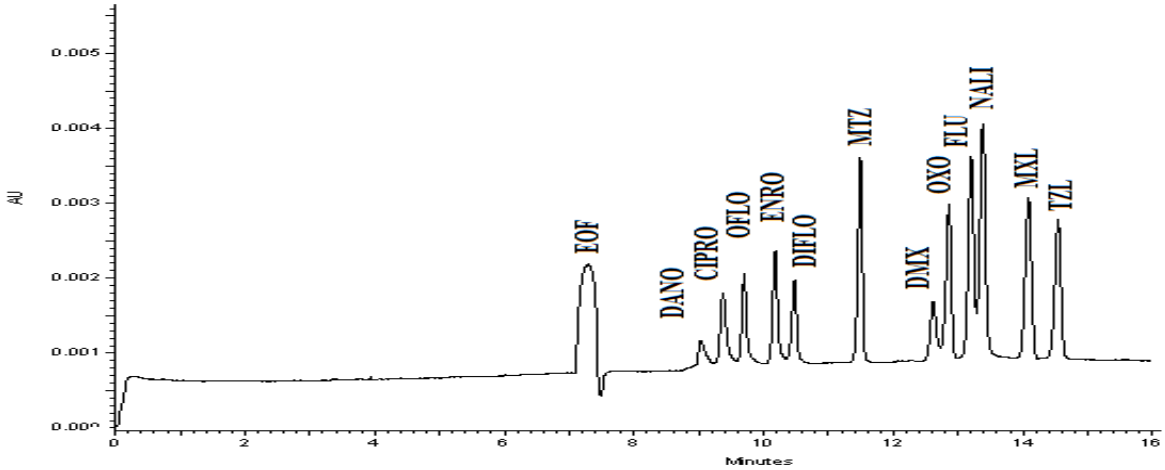


Figura 7. Eletroferograma referente às condições selecionadas para a separação de QNs e SFs por CE. Condições eletroforéticas descritas na tabela 8.

4.2 Extração

O preparo de amostra é um requisito essencial para um método sensível e seletivo destinado às análises em matrizes complexas (DIONISIO, et al., 2010).

Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de antimicrobianos na ração, ou mesmo em formulações em pós-solúveis ou comprimidos, relatam

procedimento de extração dos analitos utilizando a técnica de extração sólido-líquido (PASCHOAL, 2012), sendo esta a técnica mais amplamente utilizada para extração de medicamentos veterinários (PRESTES, et al, 2013). Para isso, o procedimento de extração baseou-se no trabalho de REZENDE (2012), demonstrado na Figura 2.

A fim de otimizar o procedimento de extração dos analitos, garantindo a seletividade do método, alguns parâmetros foram analisados, tais como:

- ✓ Escolha do solvente extrator
- ✓ Estabilidade dos analitos em alta temperatura

4.2.1 Escolha do solvente extrator

A seleção do solvente de extração é um dos pontos fundamentais no desenvolvimento de um método de extração, pois com isso é possível remover possíveis interferentes e extrair somente o analito de interesse (JARDIM, 2010).

De acordo com PRESTES (2009), os principais solventes extratores utilizados para a extração de multiresíduos são: ACN, ACE e MeOH, sendo esses analisados no presente trabalho. Esses solventes apresentam como principais vantagens: solubilidade em água e promovem a extração em uma fase única quando em contato com a matriz.

Como pode ser observado na Figura 8, o solvente que apresentou melhor desempenho de extração foi a ACN, no qual houve diferença estatisticamente significativa, conforme teste Tukey obtido pelo *software* GraphPrism versão 5.0. Isto também foi observado por GUIDE, et. al (2017) e DUBREIL, et. al (2016), devido a maior solubilidade das SF e QN neste solvente.

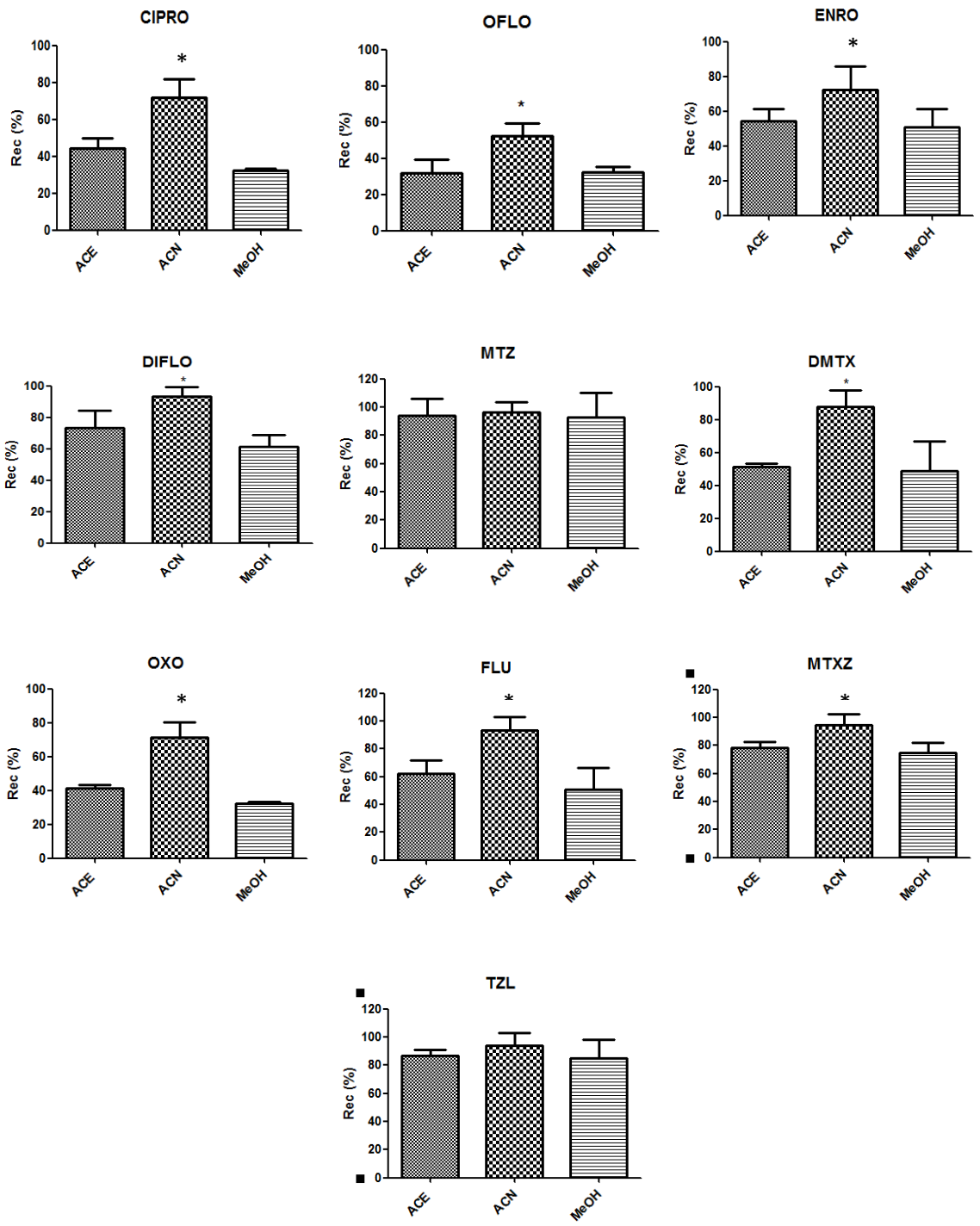


Figura 8. Avaliação de diferentes solventes para extração de SF e QN em ração para peixe. *Diferença significativa $p \leq 0{,}05$. CIPRO (Ciprofloxacino), OFLO (Ofloxacino), ENRO (Enrofloxacino), DIFLO (Difloxacino), MTZ (Sulfametazina), DMX (Sulfadimetoxina), OXO (Ácido Oxolínico), FLU (Flumeequina), MTXZ (Sulfametoxazol), TZL (Sulfatiazol)

4.2.2 Estabilidade dos analitos em alta temperatura

Durante o processo de extração, a ração de peixe foi fortificada com SF e QN, utilizando solução padrão metanólica em suas respectivas doses terapêuticas. Em seguida, se fez necessário a evaporação do solvente com o auxílio de uma centrífuga a vácuo utilizando altas temperaturas. Porém, até o presente momento, o comportamento desses analitos frente a altas temperaturas é desconhecido. Para isso, as SF e QN foram submetidas a testes de estabilidade, onde os analitos foram expostos à temperatura de 60°C por 30 minutos e comparados com analitos sem exposição à temperatura (controle). Os resultados são demostrados na Figura 9.

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa de estatística Graph Pad Prism® (versão 5.0). Os valores obtidos foram comparados com os resultados dos analitos sem a exposição à temperatura (controle) de acordo com o teste *t* de *Student*, assumindo diferenças significantes para $p < 0,05$.

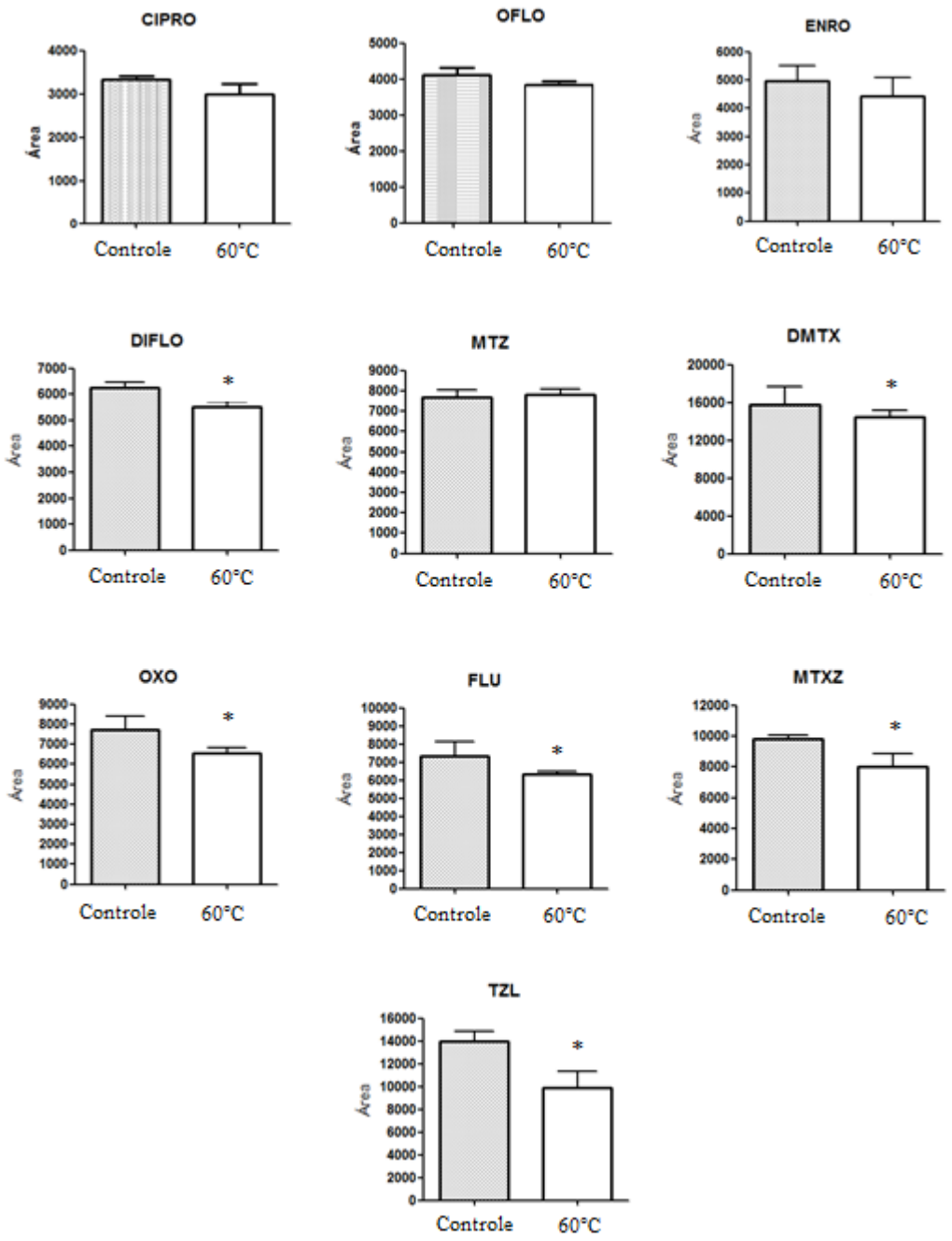


Figura 9. Avaliação da estabilidade das SF e QN frente à exposição à alta temperatura (60°C).*Diferença significativa $p \leq 0,05$. Controle: analitos sem exposição à temperatura. CIPRO (Ciprofloxacino), OFLO (Ofloxacino), ENRO (Enrofloxacino), DIFLO (Difloxacino), MTZ (Sulfametazina), DMX (Sulfadimetoxina), OXO (Ácido Oxolínico), FLU (Flumeequina), MTXZ (Sulfametoxazol), TZL (Sulfatiazol).

Após a avaliação da estabilidade, pode-se observar que os analitos sofreram degradação na temperatura de 60°C no período de 30 minutos. Assim, optou-se por não utilizar esta etapa no processo de extração. Para isso, a solução contendo os fármacos era evaporada com o auxilio de ar comprimido sem efeito da temperatura.

4.3 Validação do método

A adaptação ou implementação de um método conhecido envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo é denominado de validação. Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos. Sendo assim, o objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (BRITO et al., 2003).

4.3.1 Seletividade

A seletividade é definida como a capacidade de um método quantificar, com exatidão, o analito na presença de interferentes existentes na amostra, que podem ser substâncias quimicamente relacionadas com o analito, como excipientes, metabólitos, produtos de degradação, impurezas e outros (THOMPSON, 2002). Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI, 2004). Portanto, recomenda-se que a seletividade seja o primeiro parâmetro avaliado na validação.

Para avaliar a seletividade do método para análise das SF e QN foram realizados dois grupos de amostras: i) matriz branca, que consiste na ração triturada sem a adição dos fármacos e ii) matriz fortificada, que consiste na ração triturada contendo os fármacos de interesse na concentração pré-estabelecida, 15 $\mu g\ mL^{-1}$ (n = 5).

Como pode ser observada na Figura 10**,** a seletividade pode ser comprovada, pois não foram observados picos interferentes nos tempos de migração correspondentes as SF e QN.

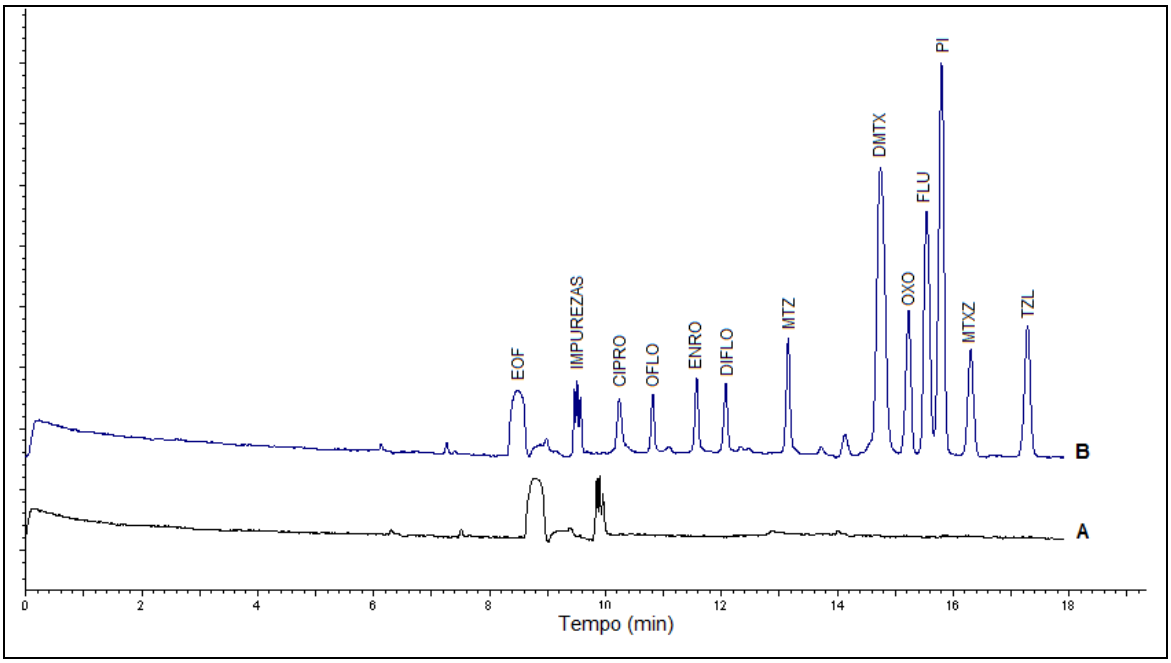


Figura 10. Eletroferograma representando a seletividade do método. (A) matriz branca e (B) matriz fortificada. Condições eletroforéticas: vide tabela 7.

4.3.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI, 2004).

A linearidade é determinada por relação matemática e gráficos de calibração, seguidos de um tratamento estatístico. Essas relações podem ser expressas como uma equação de reta (curva de calibração analítica). Matematicamente, os coeficientes de uma curva analítica podem ser estimados utilizando o método matemático das regressões lineares, onde é possível calcular o coeficiente de correlação (*r*). Este coeficiente permite uma estimativa da linearidade da curva obtida, pois um valor de *r* próximo de 1,0 evidencia menor dispersão do conjunto de pontos experimentais (SANTOS, 2009).

Para a determinação da linearidade das SFs e QNs, foram construídas curvas de calibração analítica em seis níveis de concentrações (10, 15, 20, 25, 30, 35 µg g^{-1} de ração e 20 µg g^{-1} de ração do PI), em triplicata. O tratamento estatístico das curvas analíticas envolveu a determinação da equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e do coeficiente de correlação linear (r). Na Tabela 8 estão apresentadas as

equações da reta e o valor de *r* obtido para as SFs e QNs. Nota-se que os valores de *r* estão todos acima de 0,99, atendendo as recomendações da ANVIA, 2012, indicando, assim, a linearidade na faixa de trabalho.

Tabela 8. Parâmetros de linearidade do método para análise das SF e QN

Compostos	**Linearidade**		
	Equação	**r**	**$F_{calculado}$ [a]**
CIPRO	y = 0,003 x + 0,02140	0,992	2,66
OFLO	y = 0,0032 x + 0,0161	0,990	1,56
ENRO	y = 0,0039 x + 0,0196	0,993	0,93
DIFLO	y = 0,0036 x + 0,0030	0,997	1,79
MTZ	y = 0,0083 x + 0,0622	0,991	0,35
DMTX	y = 0,0348 x + 0,1283	0,990	1,30
OXO	y = 0,0204 x – 0,0437	0,994	1,16
FLU	y = 0,0296 x – 0,0554	0,991	3,16
MTX	y = 0,0121 x + 0,0279	0,991	2,67
TZL	y = 0,0157 x + 0,0418	0,990	2,70

Curva de calibração preparada na faixa linear de 10 – 35 µg mL^{-1} (n=3)
[a] Valor do $F_{calculado} \leq F_{crítico\ 95\%} = 3,26$

Para avaliar a linearidade do método analítico, os cálculos de regressão linear não são suficientes, sendo adequado avaliar também os valores de resíduos da regressão linear (PASCHOAL, 2008). O gráfico de resíduos é um gráfico usado para examinar a qualidade do ajuste em regressão, ajudando a determinar se as pressuposições dos mínimos quadrados comuns estão sendo satisfeitas (ROCHA, 2015).

Para isso, foi realizada a avaliação da homocedasticidade das variâncias ao longo da faixa de trabalho, através do teste estatístico de F de Fisher. O valor de F foi calculado pela razão da maior pela menor variância obtida para os 6 níveis de concentração avaliados e, em seguida, comparado com o valor de $F_{crítico,}$ para o nível de confiança de 95%. Se o valor de $F_{calculado} < F_{crítico}$ considera-se que as variâncias dos níveis da curva analítica são estatisticamente iguais, ou seja, os dados são homocedásticos (ALMEIDA, et al., 2009). Sendo assim, a Tabela 8 mostra que, para todos os analitos a regressão linear é considerada satisfatória.

4.3.3. Precisão

A precisão do método foi determinada através das análises de repetibilidade e precisão intermediária do método analítico. Para isso foi calculado o coeficiente de variação (CV %) para os três níveis de concentração (10, 25 e 35 µg g^{-1}), em sextuplicata. Os resultados estão resumidos na Tabela 9 e indica que o método é preciso, de acordo com os critérios de aceitação (CV ≤ 20%) (MAPA, 2011).

Tabela 9. Repetibilidade e Precisão Intermediária do método para análise das SF e QN

Fármacos	**Concentração Nominal (µg g^{-1})**	**Repetibilidade (n = 6)[a]**		**Precisão Intermediária (n = 3)[b]**
		Conc. Obtida (µg g^{-1})	**CV (%)**	**CV(%)**
	10	10	10	7
CIPRO	25	24	3	5
	35	34	4	3
	10	10	9	8
OFLO	25	24	4	4
	35	35	6	5
	10	10	7	6
ENRO	25	24	3	2
	35	36	4	3
	10	10	9	10
DIFLO	25	24	3	2
	35	35	2	3
	10	9	5	5
METAZ	25	24	2	3
	35	35	1	2
	10	10	3	2
DIMETOX	25	25	3	2
	35	35	2	4
	10	10	7	7
OXO	25	24	3	3
	35	35	1	2
	10	10	5	5
FLU	25	25	1	2
	35	35	1	2
	10	10	4	7
METOX	25	24	1	3
	35	35	2	2
	10	9	3	3
TIAZOL	25	25	1	1
	35	34	1	2

[a] n = número de replicatas; [b] n = número de dias;

4.3.4 Veracidade/Recuperação

A veracidade do método foi expressa através dos valores obtidos pelas análises de recuperação. Para avaliar a recuperação do método foram analisados três níveis de concentração (10, 25 e 35 µg g^{-1}), em sextuplicata.

A recuperação, calculada para suas respectivas concentrações, está representada na Tabela 10. Como podem ser observados, os resultados estão dentro da faixa preconizada pelo guia do MAPA (2011), que é de 80 – 110%, indicando, desta forma, a veracidade do método.

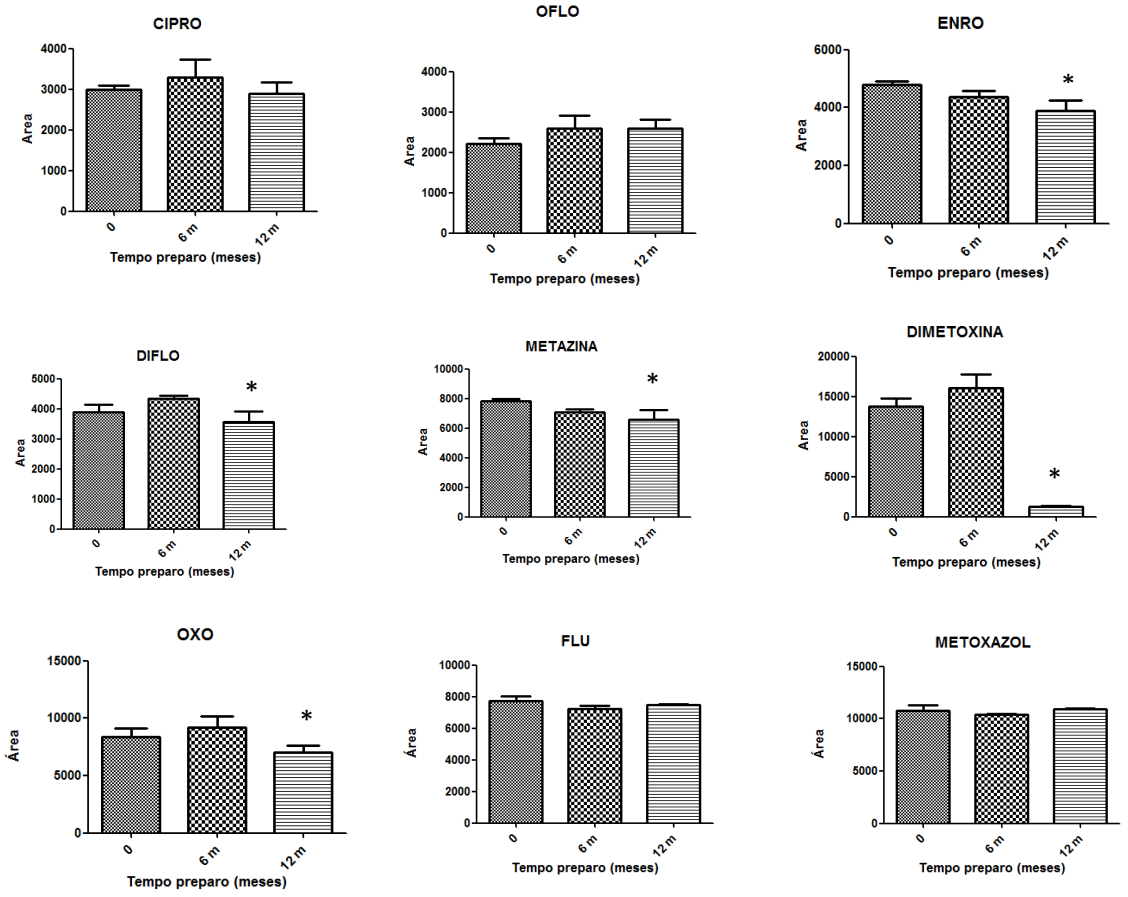
Tabela 10. Veracidade/Exatidão do método para análise das SF e QN

Fármacos	Concentração Nominal ($\mu g\ g^{-1}$)[a]	Recuperação %
CIPRO	10	102
	25	101
	35	100
OFLO	10	103
	25	97
	35	98
ENRO	10	106
	25	100
	35	104
DIFLO	10	100
	25	95
	35	101
MTZ	10	108
	25	102
	35	101
DMTX	10	98
	25	101
	35	100
OXO	10	107
	25	97
	35	100
FLU	10	95
	25	104
	35	98
MTX	10	104
	25	96
	35	101
TZL	10	92
	25	102
	35	99

4.3.6 Estabilidade

De acordo com o guia do MAPA, a estabilidade da solução padrão deve ser estudada nas condições e no período de armazenamento nos quais a solução padrão é armazenada no laboratório. Recomenda-se comparar a resposta instrumental gerada por uma solução padrão armazenada com a resposta instrumental gerada por uma solução padrão recém preparada.

O parâmetro estabilidade avaliou as condições de armazenamento das soluções padrão utilizada neste estudo. Para isso, amostras recém-preparadas foram comparadas com amostras preparadas e armazenadas à – 20° nos períodos de seis e doze meses. Para os analitos CIPRO, OFLO, MTX e FLU não houve diferença significativa em relação a estabilidade em até doze meses (Figura 11). Já os demais fármacos, apresentaram uma instabilidade frente a essas condições, tendo maior destaque DMTX, que após doze meses apresentou uma degradação de 86%.



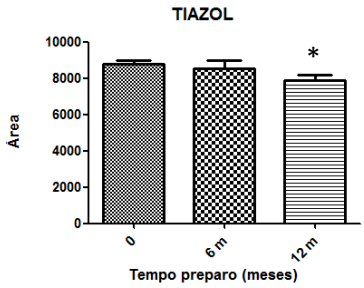


Figura 11. Teste de estabilidade em solução padrão para análise de SF e QN. *Diferença significativa, $p \leq 0,05$

4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO

4.4.1 Incorporação dos fármacos na ração

As rações em aquicultura representam de 40 a 70% dos custos totais de uma produção. Considerando isso, é importante conhecer todas as variáveis que podem influenciar no aproveitamento desse insumo em sistemas de produção aquícolas. Quanto melhor esse item de dispêndio for manejado e ajustado a cada um dos sistemas de produção, menor será a influência deste no custo total de produção, o que irá promover maior retorno para o investidor (IWACHITA, 2014).

Existem, basicamente, duas principais formas de incorporação dos fármacos na ração: i) através da ração triturada, em que se adicionam os fármacos de interesse e em seguida passa pelo processo de compressão. Porém, esse método não é vantajoso, pois compromete a principal característica das rações extrusada, que é a flutuabilidade dos grânulos. ii) através da adição dos fármacos de interesse em solução, no qual esta solução entra em contato com os grânulos e os fármacos sofrem o processo de difusão na ração. Neste caso, não tem a necessidade de triturar a ração, tornando o processo mais rápido, simples e a ração não perde suas características iniciais.

Levando isso em consideração, diferentes formas de incorporação de SF e QN na ração extrusada foram estudadas. Para o estudo de incorporação foram utilizados os fármacos CIPRO, ENRO, MTZ, DMTX e MTXZ.

A incorporação dos fármacos na ração extrusada foi realizada a partir do preparo de uma solução etanólica contendo os fármacos solubilizados e adicionados à ração. Após o processo de incorporação do fármaco, a ração foi quantificada para avaliar a concentração obtida e avaliar o rendimento da incorporação dos fármacos na ração.

Tabela 12. Rendimento do processo de incorporação dos fármacos na ração.

Fármacos	Rendimento (%)[a]		
	Manual ; CV%[b]	Pulverizador ; CV% [b]	Leito Fluidizado; CV% [b]
CIPRO	77 ; 2%	59 ; 4%	88 ; 2%
ENRO	67 ; 2%	35 ; 18%	87 ; 3%
MTZ	58 ; 3%	29 ; 21%	80 ; 3%
DMTX	79 ; 10%	58 ; 7%	93 ; 3%
MTXZ	81 ; 5%	51 ; 4%	93 ; 1%

[a] n = 3; [b]CV (%) = coeficiente de variação em %

Como pode ser observado, o método utilizando o pulverizador não alcançou um rendimento ideal, pois a solução contendo o fármaco era desperdiçada, onde a vazão não permitia que a solução atingisse a ração diretamente. No método manual, também não houve uma incorporação dos fármacos adequada, pois durante a agitação mecânica foi observado que não havia uma homogeneização uniforme da solução contendo os fármacos na ração, resultando, assim, na baixa concentração dos fármacos nos péletes. Portanto, o método que apresentou melhor rendimento de incorporação dos fármacos na ração foi via leito fluidizado, como já esperado. A mecanização deste método juntamente com fluxo e temperatura constantes proporcionou melhor homogeneização dos fármacos, resultando em melhor adesão dos analitos na superfície do pélete. Assim, este método foi escolhido para realizar o estudo de lixiviação.

4.4.2 Estudo do perfil de lixiviação

Na piscicultura, o tratamento dos animais doentes é realizado, principalmente, através da administração do medicamento via ração para toda população que compartilha o mesmo ambiente. Com isso, o fármaco fica disponível aos animais por um determinado período de tempo. Esse período que a ração medicada fica em contato com o meio aquático proporciona o processo de lixiviação, fazendo com que o fármaco migre para o meio aquoso, resultando, assim, na diminuição da dose terapêutica, contaminação do meio ambiente e disseminação do fármaco.

De acordo com CANTELMO (2002), o tempo médio que a ração fica disponível na água para serem consumidas é de até dez minutos. Assim, nota-se a importância da

estabilidade das rações no meio aquoso, para que não haja a perda dos fármacos para água. Diante disso, foi avaliado o processo de lixiviação de diferentes antimicrobianos, comumente utilizados na piscicultura. Os resultados foram analisados pelo programa de estatística Graph Pad Prism® (versão 5.0), assumindo diferenças significantes para $p < 0,05$.

Tabela 13. Estudo de lixiviação das SF e QN na ração para peixe

Tempo de exposição na água (min)	**Lixiviação (%)**				
	CIPRO*	**ENRO**	**MTZ***	**DMTX**	**MTXZ**
5	10	9	5	5	8
10	11	13	16	5	10
20	18	13	16	6	10
30	18	13	19	6	13

*Diferença significativa estatisticamente ($p \leq 0,05$)

Conforme os dados representativos da Tabela 13, os fármacos que apresentaram perdas significativas em função do tempo de exposição da ração na água foram CIPRO e MTZ. Isso significa que, com o tempo máximo de 30 minutos houve lixiviação de 18 % para CIPRO e 19 % para MTZ. Considerando o tempo máximo que a ração fica exposta na água, que é de 10 minutos, essa perda corresponde a 1,650 mg g^{-1}/peixe/dia para CIPRO e 2,400 mg g^{-1}/ peixe/dia para MTZ.

O processo de lixiviação ocorre devido, principalmente, às características de polaridade de cada fármaco, como CIPRO (logP -0,81) e MTZ (logP 0,65) são os mais polares dentre os fármacos estudados, esses foram os que mais sofreram com a lixiviação.

Considerando um sistema intensivo de cultivo, essa perda de fármacos para o ambiente torna-se preocupante, uma vez que pode contribuir para ineficiência do tratamento, prejudicar a qualidade da água e contribuir para resistência bacteriana.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

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

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RE n° 899**, 29 de maio de 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

BURRIDGE, L. et al. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture.** v. 306, 7-23, 2010.
BRITO, N. M. et al., Validação de métodos analíticos: estartégia e discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente,**v. 13, 129-146, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SAMUELSEN, O.B. Pharmacokinetics of quinolones in fish: A review. **Aquaculture**, v 255, 55–75, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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