



SILVIA PILCO QUESADA

**“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO EMPREGANDO LC-MS/MS QT_oF PARA A
DETERMINAÇÃO DE FLUOROQUINOLONAS EM PEIXES”**

***“DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL
METHOD USING LC-MS/MS QT_oF FOR THE
DETERMINATION OF FLUOROQUINOLONES IN FISH”***

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SILVIA PILCO QUESADA

**“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
EMPREGANDO LC-MS/MS QT_oF PARA A DETERMINAÇÃO DE
FLUROQUINOLONAS EM PEIXES”**

Orientador: Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

Co-orientador: Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal

**“DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD
USING LC-MS/MS QT_oF FOR THE DETERMINATION OF
FLUROQUINOLONONES IN FISH”**

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

Master Dissertation presented to the Food Science Post-graduation Program of the School of Food Sciences of the University of Campinas to obtain the Master grade in Food Sciences.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA POR SILVIA PILCO QUESADA,
E ORIENTADA PELO PROF. DR. FELIX G. R. REYES.

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

**CAMPINAS
2012**

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

P641d Pilco Quesada, Silvia, 1986-
Desenvolvimento e validação de método analítico empregando LC-MS/MS QToF para a determinação de fluoroquinolonas em peixes / Silvia Pilco Quesada. -- Campinas, SP: [s.n], 2012.

Orientador: Felix Guillermo Reyes Reyes.
Coorientador: Jonas Augusto Rizatto Paschoal.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Contaminantes. 2. Medicamentos veterinários.
3. Aquicultura. 4. Tilápia. 5. Pacu. I. Reyes Reyes, Felix Guillermo. II. Paschoal, Jonas Augusto Rizatto. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Development and validation of analytical method using LC-MS/MS QToF for the determination of fluoroquinolones in fish
Palavras-chave em inglês:

Contaminants

Veterinary drugs

Aquaculture

Tilapia

Pacu

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Felix Guillermo Reyes Reyes [Orientador]

Fabiana Pilarski

Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Data da defesa: 27/08/2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

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

.....
Profa. Dra. Fabiana Pilarski
(Membro)

.....
Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim
(Membro)

.....
Profa. Dra. Elisabete Maria Macedo Viegas
(Suplente)

.....
Profa. Dra. Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz
(Suplente)

Campinas
2012

DEDICATÓRIA

Por sobre todas as coisas a Deus, por me dar a vida e iluminar meu caminho, dando-me forças e sabedoria necessária para continuar. Muito obrigado por me permitir concluir mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais Miguel y Rufina, que sempre me incentivaram e apoiaram, pelo seu intenso esforço e sacrifício na realização deste sonho.

Aos meus irmãos Alexander y Dhenis, que sempre estiveram me apoiando em cada decisão importante da minha vida.

Aos todos eles minha eterna gratidão e eterno amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Felix Guillermo Reyes Reyes pela oportunidade de realizar este trabalho, pelos ensinamentos, confiança, compreensão, ajuda e amizade.

Ao meu Co-orientador Ph. Jonas Augusto Rizatto Paschoal, pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência e ajuda.

Aos membros da banca pelas sugestões brindadas: Profa. Dra. Fabiana Pilarski Profa., Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim, Profa. Dra. Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz e Profa. Dra. Elisabete Maria Macedo Viegas.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, ao Departamento de Ciência de Alimentos, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao Programa Estudante Convênio – Pósgraduação (PEC-PG) pela bolsa de mestrado concedida.

Aos meus amigos do Laboratório de Toxicologia de Alimentos da FEA/UNICAMP. Juliana Teles, Maria José, Rafaella Carvalho, Kátia Nuñez, Michelle Del Bianchi, Luciana Branco, Silvia Helena, Renata Estaiano, pelo apoio, ajuda, conselhos, sugestões, paciência e amizade.

À minha amiga Gabrielle Dias Rosa pela companhia e incentivo desde minha chegada ao Brasil.

Aos meus amigos e irmãos na fé, Eulalia, Danielly, Eduardo, Yanette, Yanette Noemi, Maribel, Lena, Matthew, Ricardo e Salomón, pelos bons momentos de risadas, companheirismo, conselhos e amizade. Foram meus anjos nos momentos mais difíceis que passei longe da minha família.

À minha querida amiga Eulalia Vargas, que foi uma peça chave que Deus pôs na minha vida, pelos tantos lindos momentos vividos e conselhos brindados.

Aos meus amigos da Igreja Adventista do Sétimo Dia de Santa Genebra.

Aos meus professores da Universidad Peruana Unión, Alfredo Matos, Sócrates Quispe, Moises Quito e Julio Paredes, pelos ensinamentos e incentivos nos meus estudos.

À toda a família do Perú em especial ao meu tio Noé Quesada, pelos conselhos e apoio dado todo este tempo.

Ao meu bom amigo Samuel Cabanillas, obrigada pela amizade, conselhos, ânimos e boas risadas para minimizar meus temores.

Agradeço aos todos que achei nessa caminhada, mesmo que não tenha mencionado que me proporcionaram a sua ajuda e me deram ânimo para continuar...

Muito Grata!!!

Silvia Pilco Quesada

*“Meus irmãos, sintam-se felizes
quando passarem todo tipo de aflições.
Pois vocês sabem que, quando a sua fé vence essas
provações, ela produz perseverança.
Que essa perseverança seja perfeita
a fim de que vocês sejam maduros e corretos,
não falhando em nada!
Mas, se alguém tem falta de sabedoria,
peça a Deus, e ele a dará porque é generoso
e dá com bondade a todos.”*

Tiago 1:2-5

ÍNDICE

RESUMO GERAL.....	15
SUMMARY	17
INTRODUÇÃO GERAL.....	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO I	
CONSIDERAÇÕES SOBRE O USO DE FLUOROQUINOLONAS NA AQUICULTURA: UMA REVISÃO.....	22
RESUMO.....	23
SUMMARY	25
Introdução.....	26
Aquicultura Mundial	28
Aquicultura no Brasil.....	32
Importância do uso de medicamentos veterinários na aquicultura	39
Consequências do uso de medicamentos veterinários na aquicultura	43
Aspectos regulatórios dos medicamentos veterinários	48
Métodos Analíticos para determinação de resíduos de quinolonas.....	51
Considerações finais	58
REFERÊNCIAS	58
CAPÍTULO II	
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE FLUOROQUINOLONAS EM TILÁPIA (<i>Oreochromis niloticus</i>) E PACU (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) EMPREGANDO LC-MS/MS QToF	67
RESUMO.....	68
SUMMARY	69
Introdução.....	70
Materiais e Métodos	73
Solventes e reagentes	73
Equipamentos.....	74
Preparo das soluções padrões	74
Branco das matrizes tilápia e pacu	75
Procedimento de Extração.....	75
Condições cromatográficas (LC-MS/MS).....	78
Validação do método analítico	78
Resultados e Discussão	81
Preparo da amostra	81
Confirmação de Identidade por LC-MS/MS.....	82
Validação analítica.....	83
Análises de amostras disponíveis no comércio.....	89
Conclusões.....	90
Referências	91
CONCLUSÃO GERAL.....	95

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I. Considerações sobre o uso de fluoroquinolonas na aquicultura: uma revisão.

Tabela 1. Produção mundial da pesca desde 2004 até 2009.....	29
Tabela 2. Produção da aquicultura no Brasil (marinha e continental), para os anos 2008, 2009 e 2010.....	34
Tabela 3. Agentes patogênicos registrados na tilapicultura brasileira.....	40
Tabela 4. Limite Máximos de Resíduos estabelecidos para quinolonas de uso permitido na aquicultura em diferentes regiões	50
Tabela 5. Limites Máximos de Resíduos estabelecidos para as quinolonas, para fins de fiscalização no Brasil.....	51
Tabela 6. Parâmetros analíticos da validação.....	53
Tabela 7. Procedimentos para determinação de quinolonas em peixes por técnicas cromatográficas.....	56

CAPÍTULO II. Determinação de Resíduos Fluoroquinolonas em tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) empregando LC-MS/MS QToF

Tabela 1. Composição elementar e medida de massa exata para íons obtidos em solução padrão utilizando o sistema ToF-MS	84
Tabela 2. Parâmetros de validação para matriz filé de pacu	85
Tabela 3. Parâmetros de validação para matriz filé de tilápia	86

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I. Considerações sobre o uso de fluoroquinolonas na aquicultura: uma revisão.

Figura 1. Principais formas de apresentação do pescado para consumo no mundo (2009)	29
Figura 2. Tendências de consumo de pescado: crescimento por regiões mundiais no período de 2008 – 2010.....	30

Figura 3. Contribuição da aquicultura na produção mundial: principais grupos de espécies	31
Figura 4. Produção do pescado (t) no Brasil, através da aquicultura (marinha e continental) no período de 1980-2010.....	33
Figura 5. Consumo per capita brasileiro para o período de 1996 a 2010.....	34
Figura 6. Participação percentual das espécies de peixes na aquicultura continental brasileira em 2010	35
Figura 7. Tilápia do nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	36
Figura 8. Evolução da criação de tilápia no Brasil	37
Figura 9. Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	38
Figura 10. Estrutura Básica das Quinolonas	42
Figura 11. Estruturas moleculares de algumas fluoroquinolonas.....	42
Figura 12. Fluxograma dos processos envolvidos no ciclo produtivo da aquicultura..	45

CAPÍTULO II. Determinação de Resíduos Fluoroquinolonas em tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) empregando LC-MS/MS QToF

Figura 1. Estrutura molecular das fluoroquinolonas estudadas.....	73
Figura 2. Esquema do procedimento de extração do método analítico desenvolvido.....	77
Figura 3. Comparação de cromatogramas de amostras branco (A) e fortificadas (B) (100 ng g ⁻¹) de filé de pacu	87
Figura 4. Comparação de cromatogramas de amostras branco (A) e fortificadas (B) (100 ng g ⁻¹) de filé de tilápia.....	87

Lista de abreviaturas

ACN	Acetonitrila
AFRIS	Serviço Asiático de Regulação e Informação de Alimentos (<i>Asian Food Regulation Information Service</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATFA	Tetrafluoroaluminato de amônio
CBM	Concentração Bactericida Mínima,
CC α	Limite de decisão
CC β	Capacidade de detecção
CIP	Ciprofloxacina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CPVS	Compêndio de Produtos Veterinários
CVMP	Comitê para Produtos Medicinais de Uso Veterinário
CO ₂	Gás carbônico
CV	Coeficiente de variação
DAN	Danofloxacina
DSPE	Extração dispersiva em fase sólida
EC	Comunidade Europeia (<i>European Commission</i>)
EMA	Agência Europeia de Medicamentos (<i>European Medicines Agency</i>)
ENR	Enrofloxacina
ESI	Ionização por electronebulização (<i>Eletrospray Ionization</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fase Aquosa
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FDA	Administração de Drogas e Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FE	Fase Estacionaria
FFCR	Fundação de Pesquisa Química de Alimentos do Japão
FL	Detecção por fluorescência
FM	Fase Móvel
FO	Fase Orgânica
FQ	Fluoroquinolonas
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HC-SC	Canadian Food Inspection Agency
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico

ICH	Conferência Internacional de Harmonização
IDA	Ingestão diária aceitável
INP	Instituto Nacional da Pesca (<i>Instituto Nacional de Pesca</i>)
ISO	Organização Internacional para Padronização
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
JECFA	Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares (<i>Joint Expert Committee on Food Additives</i>)
KH ₂ PO ₄	Diidrogenofosfato de Potássio
LC	Cromatografia líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LMDR	Limite mínimo de desempenho requerido
LMR	Limite máximo de resíduo
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
MLC	Cromatografia Líquida Micelar (<i>Micellar Liquid Chromatography</i>)
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
MRL	<i>Maximun Residue Limit</i>
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial (<i>Mass Spectrometry in tandem</i>)
NaOH	Hidróxido de sódio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NH ₃	Amônia
NO ₂ ⁻	Nitrito
NOR	Norfloxacina
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (<i>Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos</i>)
OIE	Organização Internacional de Epizootias
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORBI	Orbifloxacina
PAMVet	Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal
PI	Padrão interno
PSA	Amina Primária Secundária (<i>Primary Secondary Amine</i>)
PNCRB	Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Carne

PNCRL	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Leite
PNCRM	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Mel
PNCRO	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Ovo
PNCRP	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Pescado
PTFE	Politetrafluoretileno
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RCAAP	Repositório Científico de Acesso Aberto de Portugal
QtoF	Quadrupolo – Tempo de voo (<i>Quadrupole – Time of light</i>)
QqQ	Triplo Quadrupolo
QuEChERS	Rápido, Fácil, Econômico, Efetivo, Robusto e Seguro (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>)
SAG	Serviço de Agricultura e Pecuária (<i>Servicio Agrícola y Ganadero</i>)
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SENASICA	Serviço Nacional de Saúde, Segurança e Qualidade Alimentar (<i>Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria</i>)
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos Para a Saúde Animal
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
TEA	Trietilamina
THF	Tetraidrofurano
ToF	Tempo de voo (<i>Time of Flight</i>)
UV	Radiação ultravioleta
WGSR	Grupo de Trabalho da Segurança de Resíduos (<i>Working Group on the Safety of Residues</i>)
WHO	World Health Organization

Desenvolvimento e validação de método analítico empregando LC-MS/MS QToF para a determinação de fluoroquinolonas em peixes

RESUMO GERAL

A aquicultura é um setor de produção de alimentos que apresenta grande crescimento em todo o mundo. O Brasil possui um alto potencial de expansão da atividade aquícola, com produção promissora de espécies exóticas como a tilápia (*Oreochromis niloticus*) e nativas como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*). Como em todo sistema intensivo de produção, o uso de medicamentos veterinários na produção aquícola se faz necessário para o controle e tratamento de doenças, visando garantir os rendimentos de produção esperados. Essas doenças podem ser causadas por parasitas, bactérias, fungos e vírus. Dentre os medicamentos mais utilizados estão os antimicrobianos, uma vez que as bacterioses são indicadas como um dos fatores principais de limitação da produção aquícola no mundo todo. Dentre os antimicrobianos comumente utilizados na aquicultura mundial destaca-se o grupo das fluoroquinolonas (FQ). O risco potencial da presença de resíduos de antimicrobianos nos produtos aquícolas é um assunto preocupante. Dentre os fatores de preocupação estão o uso irresponsável e não controlado, a falta de respeito às boas práticas veterinárias e carência de alternativas de medicamentos veterinários específicos para uso na aquicultura. Como consequência, tem-se a preocupação com a questão da resistência microbiana, assunto este muito discutido mundialmente, e que aflige e impacta tanto o próprio sistema de produção aquícola, como a saúde humana e o meio ambiente. Quando os resíduos dos antimicrobianos estão acima dos valores de limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos, passam a representar risco potencial à saúde do consumidor. Deste modo, o desenvolvimento de métodos analíticos para determinar os resíduos de fármacos veterinários presentes em produtos de origem animal se faz necessário. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método para a determinação simultânea de resíduos de norfloxacin (NOR), danofloxacin (DAN), enrofloxacin (ENR) e ciprofloxacina (CIP) em filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e

de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), utilizando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS QToF). Para a validação analítica foram considerados os seguintes parâmetros: linearidade, sensibilidade, seletividade, efeito matriz, precisão intra-dia (com amostras fortificadas e amostras incorridas) e inter-dias, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão e capacidade de detecção. Os resultados obtidos a partir da validação apresentaram conformidade com as recomendações dos guias de validação da Comunidade Europeia e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, indicando que o método é apropriado para a determinação de FQ em filé de peixe. Nenhuma das amostras (n=31) adquiridas do comércio e analisadas pelo método validado apresentou resíduos de DAN, NOR, ENR e CIP em níveis detectáveis.

Development and validation of analytical method by LC-MS/MS QToF for the determination of fluoroquinolones in fish

SUMMARY

Aquaculture is a food production sector that presents worldwide growth. Aquaculture activity in Brazil exhibits a high potential for expansion, that includes promising production of exotic as tilapia (*Oreochromis niloticus*) and native species pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*). As in every intensive production system, the use of veterinary drugs in aquaculture production is necessary for control and treatment of diseases, in order to guarantee the expected productivity. Those diseases can be caused by parasites, bacteria, fungi and viruses. Antibiotics are among the most widely used drugs, since bacterial diseases are listed as one of the main factors limiting the worldwide aquaculture production. The fluoroquinolones (FQ) antibiotic family is the most commonly used in aquaculture. The risk of the presence of antibiotics residues in aquaculture products is a matter of concern, the irresponsible and uncontrolled use of antibiotics, the disrespect to good veterinary practices, and the lack of alternatives of veterinary specific drugs for aquaculture use, are some of the matters of concern. As a consequence, it arises a current issue related to microbial resistance which may affect different areas such as aquaculture system, human health and the environment. Potential risk to the consumer health is presented when the antimicrobial residues in foods are above the established maximum residue limits (MRL). Therefore, it becomes necessary the development and validation of analytical methods in order to determine the veterinary drugs residues present in foods of animal origin. Thus, the objective of this work was to develop and validate a method for the simultaneous determination of norfloxacin (NOR), danofloxacin (DAN), enrofloxacin (ENR) and ciprofloxacin (CIP) residues in tilapia (*Oreochromis niloticus*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fillets, using liquid chromatography associated to mass spectrometry (LC-MS/MS QToF). To conduct the validation of the method the following parameters were considered: linearity, sensitivity, selectivity, matrix effect, intra-day (using spiked and incurred samples) and inter-day precision, accuracy, detection limit, quantification limit, decision limit and detection capability. The obtained results are in conformity with the guidelines recommendations

from the European Community, and the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, demonstrating that the method is suitable for the determination of FQ in fish fillet. None of the samples (n=31) acquired and analyzed by the validated method presented residues of DAN, NOR, ENR and CIP at detectable levels.

INTRODUÇÃO GERAL

Dentre os sistemas de produção de alimentos de origem animal, a aquicultura é considerada como uma das atividades que apresenta um crescimento constante em nível mundial. No Brasil, em termos econômicos, vem se mostrando muito promissora.

Considerando que o Brasil apresenta uma significativa disponibilidade de recursos hídricos e condições geográficas e climáticas favoráveis, que permitem a criação de espécies exóticas e nativas, verifica-se que o país detém um panorama com alto potencial para a exploração econômica através da aquicultura (CREPALDI *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2009).

Todo sistema intensivo de produção animal constitui-se em um ambiente favorável à disseminação de doenças, devido à maior densidade populacional dos animais, com o agravante de que, na aquicultura, o ambiente aquático propicia a proliferação de doenças infecciosas. Eventuais alterações físico-químicas bruscas no ambiente aquático, como uma queda acentuada da temperatura, por exemplo, além de práticas de manejo inadequadas, afetam diretamente o estado de saúde dos peixes. As bacterioses se destacam por serem apontadas como os principais fatores limitadores da produtividade. Entre as principais bactérias patogênicas que afligem a aquicultura destacam-se a *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas sp.*, *Vibrio spp.*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Edwardsiella tarda*, *Francisella sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Piscirickettsia salmonis*, *Plesiomonas shigelloides* (PAVANELLI *et al.*, 1998; SCHALCH *et al.*, 2005; ROTTA & QUEIROZ, 2003).

Diante do exposto, o uso de medicamentos veterinários se faz necessário para a garantia da exploração econômica viável da atividade. De forma geral, os medicamentos podem ser utilizados para o tratamento das doenças (CABELLO, 2003; GÓMEZ, 2011). As fluoroquinolonas (FQ) compõem um grupo de antimicrobianos de destaque entre os medicamentos de uso em sistemas aquícolas, devido ao seu alto potencial para o tratamento de doenças causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas. Além disso, as FQ são consideradas bactericidas, isto é, produz a morte da bactéria, apresentando CIM (Concentração Inibitória Mínima, isto é, concentração mínima do antibiótico que previne o crescimento bacteriano visível) e CBM (Concentração Bactericida Mínima, isto é, concentração mínima do antibiótico que mata 99,9% do número original de bactérias) com magnitudes semelhantes. Outra característica importante deste grupo antimicrobiano é que apresenta um prolongado

efeito pós-antibiótico e, deste modo, assegura um prolongado intervalo entre as doses, sendo necessária a administração de uma dose única diária. Dentre as FQ mais utilizadas na piscicultura mundial destacam-se a flumequina, a sarafloxacin e a enrofloxacin (WOO & BRUNO, 2011; MELLA *et al.*, 2000; BUFFÉ *et al.*, 2001; TAVARES, 1996).

Apesar da evidente importância do uso de antimicrobianos nos sistemas de produção animal, no mundo há uma grande preocupação relacionada à questão da resistência microbiana. Na aquicultura, particularmente no Brasil, essa preocupação é agravante devido a fatores como a carência de alternativas de medicamentos veterinários aprovados, o alto custo dos que estão disponíveis e as práticas veterinárias inadequadas, entre outras.

Neste contexto, torna-se evidente a necessidade de se garantir a qualidade dos produtos aquícolas destinados ao consumo humano em relação à segurança alimentar. Para tanto, têm sido estabelecidos limites máximos de resíduos (LMR) para os antimicrobianos utilizados na produção de alimentos de origem animal. Para a determinação dos resíduos dessas substâncias se faz necessário o emprego de métodos analíticos adequados, sendo que na literatura científica se destaca a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) como sendo a técnica capaz de oferecer alta seletividade e detectabilidade ao método analítico. Em relação aos espectrômetros de massas, dentre os tipos de analisadores de massas utilizados na avaliação de rotina no controle da inocuidade dos alimentos, o tempo de voo ("*time of flight*", ToF) é uma excelente ferramenta para a quantificação e confirmação de identidade de contaminantes em alimentos (JUAN-GARCÍA *et al.*, 2006; SONGSERMSAKUL & RAZZAZI-FAZELI, 2008).

No presente trabalho foi desenvolvido um método analítico para a determinação de resíduos de fluoroquinolonas em filés de peixes (tilápia e pacu), otimizando o processo de extração, e empregando LC-MS/MS QToF como técnica analítica. A partir do método analítico estabelecido e validado, foram realizadas análises de amostras de peixes de ambas as espécies estudadas, disponíveis aos consumidores no estado de São Paulo, Brasil. Espera-se que o presente trabalho contribua com os programas de controle e monitoramento de resíduos de fármacos veterinários em alimentos, estabelecidos pelos órgãos governamentais (PNCRB e PAMVet), através do método analítico desenvolvido e validado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUFFÉ, C; ARAÚJO, B. V.; DALLA COSTA, T. 2001. Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos na otimização de terapias antimicrobianas. Caderno de Farmácia. v. 17, n. 2, p. 97-109.
- CABELLO F. 2003. Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. Revista Médica Chile, n. 132, p. 1001-1006.
- CREPALDI D., FARIA P., TEIXEIRA E., RIBEIRO L., COSTA A.A., MELO D., CINTRA A., PRADO S., COSTA F.A., DRUMOND M., LOPES V., MORAES V. 2006. A situação da Aquicultura e da pesca no Brasil e no mundo. Revista Brasileira Reprodução Animal, p 81-85.
- GOMEZ F. 2011. Uso racional de los antibióticos. Jornadas Profesionales de Avicultura – Real Escuela de Avicultura. España.
- JUAN-GARCÍA A.; FONT G.; & PICÓ Y. 2007. Determination of quinolone residues in chicken and fish by capillary electrophoresis-mass spectrometry. Electrophoresis. v. 27, p. 2240-2249.
- MELLA S., ACUÑA G., MUÑOZ M., PEREZ C., LABARCA J., GONZALES G., BELLO H., DOMINGUEZ M., ZEMELMAN R. 2000. Quinolones: General characteristics of structure and classification. Revista Chilena Infectología, v. 17, n. 1, p. 53-66.
- OLIVEIRA, R. C. 2009. O Panorama da Aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, n. 2, v.1, p. 73-89.
- PAVANELLI G., EIRAS J., TAKEMOTO R. 1998. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Ed. UEM, p. 264.
- ROTTA A.; QUEIROZ F. 2003. Boas práticas de manejo (BPMs) para a produção de peixes em tanques-redes. EMBRAPA Série Documentos, n.47. Corumbá (MS). p. 27.
- SCHALCH S., BELO M., SOARES V., MORAES J., MORAES F. 2005. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. Acta Scient., Maringá, n. 27, v.2, p.297-302.
- SONGSERMSAKUL P.; RAZZAZI-FAZELI E. 2008. A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins. Journal Liquid Chromatography & Related Technologies. n. 31, p. 1641-1686.
- TAVARES W. 1996. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 2ªed, Brasil.
- WOO P., BRUNO D. 2011. Fish: Diseases and Disorders, Vol 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. 2ªed. p. 456,

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES SOBRE O USO DE FLUOROQUINOLONAS NA AQUICULTURA: UMA REVISÃO.

Este capítulo será submetido para publicação na Revista Scientia Agricola

Considerações sobre o uso de fluoroquinolonas na aquicultura: uma revisão

RESUMO

A aquicultura é o setor de produção de alimentos que apresenta grande crescimento em todo o mundo. No Brasil, esta atividade tem um alto potencial de expansão, com produção promissora de espécies exóticas e nativas, tais como a tilápia (*Oreochromis niloticus*) e o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), respectivamente. Os antimicrobianos compõem um recurso muito importante, empregado na produção aquícola para o controle e tratamento de doenças causadas por bactérias. As bacterioses têm sido apontadas como as principais causadoras de perdas de rendimentos de produção em sistemas intensivos de exploração aquícola, de modo que os antimicrobianos estão entre os fármacos veterinários de maior importância para o produtor. Porém, o uso indiscriminado dessas substâncias vem se tornando motivo de preocupação no mundo todo, principalmente no que concerne a questão da resistência microbiana, com potencial impacto tanto no sistema de produção animal como na saúde humana e no meio ambiente. No que diz respeito a segurança alimentar, são estabelecidos níveis de tolerância, denominados limites máximos de resíduos (LMR), os quais consistem na concentração máxima permitida ou tolerada para a presença de um determinado fármaco em produtos de origem animal destinados ao consumo humano. Para a certificação de que os alimentos de origem animal estejam isentos, ou com níveis residuais de fármacos veterinários abaixo de seus respectivos LMR, faz-se necessária a disponibilização de métodos analíticos capazes de determinar a presença dessas substâncias nos produtos de origem animal com seletividade, detectabilidade e confiabilidade adequadas. O presente trabalho consiste numa revisão bibliográfica sobre os aspectos gerais da produção na aquicultura mundial e no Brasil, a importância sobre do uso de medicamentos veterinários, a questão da resistência microbiana e seus impactos na produção aquícola, na saúde humana e no meio ambiente. Ainda, são discutidos aspectos relevantes para o estabelecimento dos métodos analíticos destinados à determinação de resíduos de fármacos veterinários em filés de peixe, além dos procedimentos envolvidos para a garantia da confiabilidade analítica dos resultados obtidos através desses métodos.

Palavras-chave: Aquicultura, medicamentos veterinários, resíduos, resistência microbiana, limite máximo de resíduo, LC- MS/MS.

Considerations on the use of fluoroquinolones in aquaculture: a review

SUMMARY

Aquaculture is a food production sector that presents worldwide growth. Aquaculture activity in Brazil exhibits a high potential for expansion, that includes promising production of exotic and native species such as tilapia (*Oreochromis niloticus*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*), respectively. Antimicrobials constitute a very important resource used in aquaculture for the control and treatment of diseases caused by parasites. The bacterial diseases have been identified as the main cause of productivity losses in aquaculture intensive systems, so that the antimicrobials are among the most important veterinary drugs for the fish farm producers. However, the indiscriminate use of these substances has been of great concern all over the world, especially regarding the issue of antimicrobial resistance, which has a potential impact over the livestock system, the human health, and the environment. Regarding to food safety, tolerance levels also called maximum residue limits (MRL) are established for the veterinary drug residues in foods. The MRL is the maximum concentration permitted for the presence of a specific compound in foods intended for human consumption. To certificate that foods of animal origin are exempt, or with residual levels of veterinary drugs below their respective MRL, it is necessary to develop and validate analytical methods, to determine the presence of those substances in food products with appropriate selectivity, detectability and reliability. The present work consists of a literature review of general aspects on aquaculture production over the world and in Brazil, the importance of using veterinary drugs, the antimicrobial resistance issue and its impact on aquaculture production, human and environment health. Furthermore, relevant aspects for the establishment of analytical methods for the determination of veterinary drug residues in fish fillets, as well as the procedures to ensure the reliability of the analytical method will be discussed.

Keywords: Aquaculture, veterinary drugs, residues, microbial resistance, maximum residue limit, LC- MS/MS.

Introdução

No mundo, a aquicultura é considerada um importante setor produtivo de alimentos. A demanda pelo consumo de peixes vem aumentando progressivamente, sendo inserida na dieta em virtude de uma mudança no hábito alimentar das pessoas, em busca de uma dieta mais saudável, com perfil nutricional adequado (CREPALDI *et al.*, 2006).

O Brasil possui 13,8% da água doce disponível no planeta e uma ampla faixa marítima, proporcionando características naturais vantajosas com alto potencial de exploração aquícola, tanto na produção de peixes exóticos como a tilápia, como de peixes nativos como o pacu (FONSECA & SILVA, 2004).

No entanto, como em todo sistema de produção animal, é inevitável o surgimento de doenças, tendo como consequência, potenciais perdas econômicas. Na aquicultura, o meio aquático favorece o surgimento e a disseminação de doenças infecciosas. Eventuais alterações físico-químicas bruscas no ambiente aquático, como uma queda acentuada da temperatura, por exemplo, afetam diretamente o estado de saúde dos peixes, podendo deixá-los mais vulneráveis ao surgimento de doenças infecciosas. Este cenário, somado a eventuais práticas de manejo inadequadas e más condições ambientais, favorecem o aparecimento de doenças parasitárias, bacterianas, virais e fúngicas (ROBERTS & BULLOCK, 1980; SCHALCH *et al.*, 2005).

Diante do exposto, o uso de medicamentos veterinários se faz necessário no tratamento de doenças infecciosas. De um modo geral, os medicamentos veterinários são utilizados com fins terapêuticos, profiláticos, metafiláticos ou como promotores de crescimento (CABELLO, 2003). Dentre os principais antimicrobianos utilizados na aquicultura em todo o mundo destacam-se a oxitetraciclina, o florfenicol, a eritromicina e a enrofloxacina, entre outros (FAO, 2005).

Porém, o emprego dessas substâncias em animais destinados à produção de alimentos precisa ser criterioso, visto que o uso inadequado e não controlado promove riscos potenciais relacionados à resistência microbiana, os quais podem afligir tanto o próprio sistema de produção, como também, a saúde humana e o meio ambiente. Com relação ao impacto na produção aquícola, uma vez estabelecida a resistência microbiana, para manter a eficácia dos antimicrobianos será necessária a aplicação de doses mais altas. Com relação ao impacto na saúde humana, a ingestão de resíduos de fármacos veterinários acima dos limites considerados seguros é uma questão

importante de saúde pública, devido à indução de possíveis efeitos adversos tais como alergias e problemas com a flora intestinal humana, entre outros. Com relação à contaminação ambiental causada pelo uso de medicamentos veterinários na aquicultura, dentre as consequências destacam-se é o amplo período de permanência (anos) dos fármacos no meio ambiente, alterando assim, o fitoplâncton, zooplâncton e os processos químicos dos sedimentos (FAO, 2010; FAO/OIE/WHO, 2006; LUNESTAD, 1992).

Para garantir a qualidade dos produtos destinados aos consumidores, no que diz respeito à segurança alimentar frente à possível presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos de origem animal, são estabelecidos níveis de tolerância, chamados limites máximos de resíduos (LMR). Para regulamentar o uso destas substâncias em animais de produção, há organizações internacionais, como o Codex Alimentarius, e regionais, como a Agência Europeia de Medicamentos (EMA). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Ministério da Saúde criaram programas de monitoramento de resíduos de fármacos veterinários em alimentos que são, respectivamente, o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB e o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet).

Entre os métodos analíticos mais citados na literatura científica para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em peixes, destaca-se o uso da cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), devido às características de alta seletividade e detectabilidade que essas técnicas proporcionam além de serem imprescindíveis para a confirmação da identidade dos analitos (POZO *et al.*, 2006).

Este trabalho tem como objetivo, apresentar uma revisão sobre a produção da aquicultura mundial e no Brasil, ressaltar a importância do uso de medicamentos veterinários na aquicultura, abordar os riscos potenciais decorrentes do uso indiscriminado dos mesmos (em particular das fluoroquinolonas), e os impactos produzidos na produção aquícola, na saúde humana e no meio ambiente, assim como, apresentar os métodos analíticos mais comumente utilizados para a determinação de resíduos de fármacos veterinários em peixes, com destaque para a técnica analítica LC-MS/MS.

Aquicultura Mundial

No mundo todo, a aquicultura continua sendo um importante setor produtivo de alimentos. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2010), o consumo *per capita* de pescado, como consequência do desenvolvimento da aquicultura no mundo, aumentou de 0,7 kg em 1970 para 7,8 kg em 2008, calculando-se um incremento médio anual de 6,6%. O consumo *per capita* de pescado na Ásia (excluindo a China) é de 13,9 kg, na Europa 20,7 kg, na América do Norte e América Central 18,9 kg, América do Sul 8,4 kg e África 8,3 kg.

A produção aquícola mundial destina-se principalmente ao consumo de produtos frescos. Em 2009, segundo dados da FAO (2010), os pescados foram principalmente destinados ao consumo na forma fresca (46,8%), seguidos pelo pescado congelado (26,8%), o pescado preparado para conserva (14,4%) e o pescado curado (10,2%) (Figura 1). Cabe ressaltar que, no mundo, a China e o Japão são os maiores consumidores dos produtos aquícolas, nos quais existe maior disponibilidade de pescado fresco. Essas estatísticas não refletem a realidade de outros países, como por exemplo, o Brasil, onde o consumo é principalmente de pescado congelado.

Nos últimos sessenta anos, a produção aquícola vem crescendo e ganhando espaço em relação à pesca extrativa. Em 2009, a produção total da pesca mundial atingiu o equivalente a 145 milhões de toneladas, das quais, aproximadamente 38% foram provenientes da aquicultura e 62% provenientes da pesca extrativa. No período de 2004 a 2009, a pesca extrativa apresentou uma ligeira diminuição sendo que a aquicultura incrementou-se em, aproximadamente, 7% (OCDE-FAO, 2011) (Tabela 1). Com respeito à variedade de espécies destinadas à alimentação de que dispõe a aquicultura, pode-se mencionar mais de 240, contando animais e plantas aquáticas (CREPALDI *et al.*, 2006).

Em relação ao consumo de pescado, a tendência de crescimento verificada no período de 2008 a 2010 não é uniforme para todas as regiões mundiais (Figura 2). A região que envolve a Oceânia apresenta um maior crescimento (24,6%), seguida pela América do Norte (21,1%), Europa (19,6%), Ásia (17,5%), América Latina (9,0%) e África (8,1%).

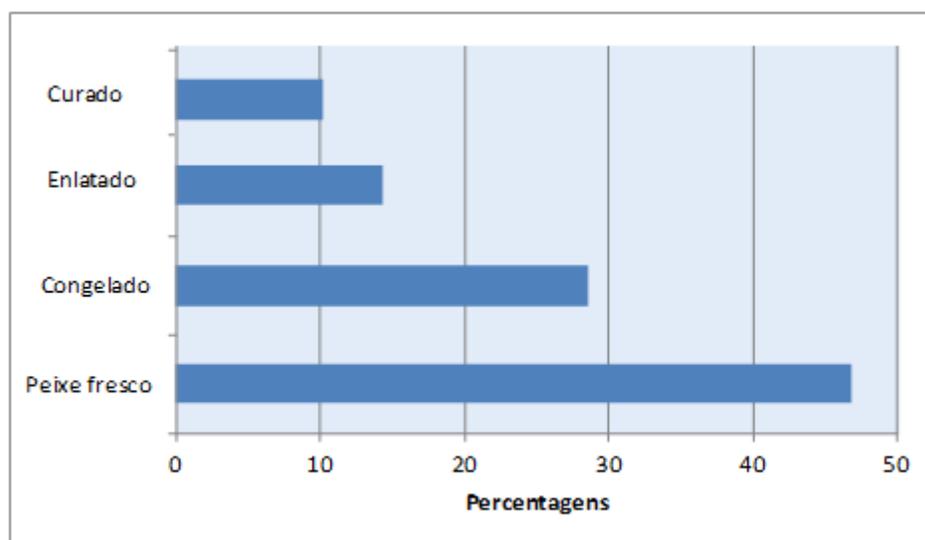


Figura1. Principais formas de apresentação do pescado para consumo no mundo (2009)

Fonte: FAO, 2010

Tabela 1. Produção mundial da pesca desde 2004 até 2009

	2004	2005	2006	2007	2008	2009
	(Milhões de toneladas)					
PRODUÇÃO						
TOTAL CAPTURA	92,4	92,1	89,7	89,9	89,7	90,0
TOTAL AQUICULTURA	41,9	44,3	47,4	49,9	52,5	55,1
TOTAL PESCA MUNDIAL	134,3	136,4	137,1	139,8	142,3	145,1

Fonte: FAO, 2010

Apesar das estatísticas promissoras, tem-se que considerar que há fatores limitantes para o desenvolvimento do setor aquícola mundial, dentre os quais podem ser considerados o custo elevado da terra, as questões ambientais, o custo energético, a falta de mão-de-obra capacitada e a falta de capital para investimentos nos países em desenvolvimento (FAO, 2010; CREPALDI *et al.*, 2006).

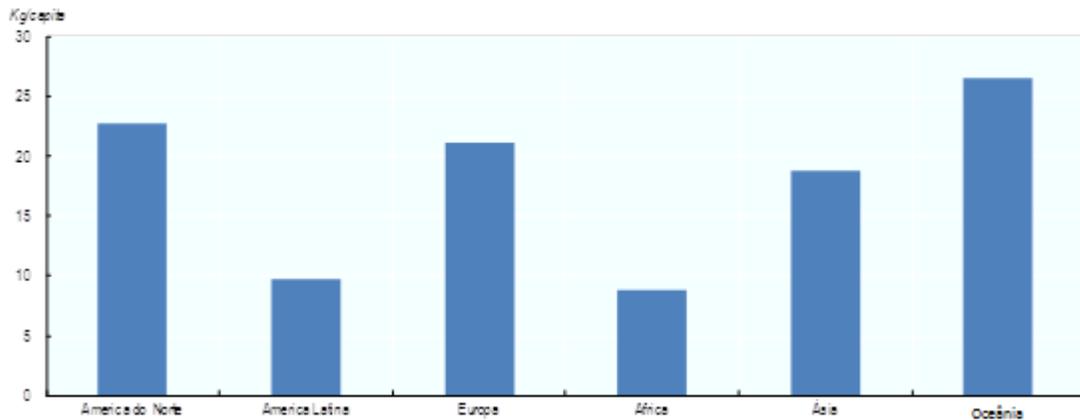


Figura 2. Tendências de consumo de peçado: crescimento por regiões mundiais no período de 2008-2010

Fonte: OCDE-FAO, 2011

Contudo, podem-se mencionar fatores que são incentivos para o desenvolvimento da aquicultura mundial, tais como a possibilidade de ofertar produtos de qualidade, que brindem uma maior qualidade de vida para a população e o incremento das possibilidades de produção em áreas antes não consideradas adequadas para a criação de peixe, por meio da utilização de sistemas que visem à otimização do uso dos recursos hídricos, como os tanques-rede e os sistemas de reutilização da água.

Em 2008, a aquicultura gerou 76,4% da produção mundial de peixes de água doce, 68,2% de peixes que ao longo do seu ciclo de vida migram entre a água doce e a água salgada, 64,1% de moluscos, e 46,4% de crustáceos (Figura 3). Segundo a FAO (2010), a produção mundial de peixes de água doce em 2008 foi dominada pelas carpas (*Cyprinus carpio*) com 20,4 milhões de toneladas (71,1%). Existe uma minoria de peixes de água doce que são criados em água salobra (2,4%), como exemplo está a tilápia criada no Egito. Com relação à produção de carpas, em 2008, a China foi o primeiro produtor mundial (70,7%) e o segundo a Índia (15,7%). Também pode-se mencionar outros produtores minoritários, tais como, o Bangladesh, a Mianmar, o Vietnam, a Indonésia e o Pakistan.



Figura 3. Contribuição da aquicultura na produção mundial: principais grupos de espécies

Fonte: FAO, 2010

Ao longo dos anos, tem sido introduzida na aquicultura, a criação de espécies híbridas, as quais consistem de peixes com características intermediárias a partir de uma mistura de conjuntos gênicos de espécies diferentes. Assim, a criação destas espécies tornou-se amplamente difundida, já que apresentam grande adaptabilidade a diversas condições e apresentam crescimento mais rápido (AMARAL *et al*, 2010). Entretanto, atualmente não há um panorama claro do nível de produção aquícola total de híbridos no mundo. Em vários países são empregados um número considerável de híbridos para fins aquícolas. Dos 1,1 milhões de toneladas de tilápia-do-nilo produzidas na China, aproximadamente uma quarta parte são híbridos entre a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e a tilápia azul (*O. aureus*). No Brasil, cria-se o híbrido tambacu (♀ tambaqui e ♂ pacu), sendo que nos últimos anos sua produção superou as 10 000 toneladas (FAO, 2010).

A aquicultura mundial tem fomentado a demanda e o consumo de espécies como os camarões, o salmão, o mexilhão e a tilápia que deixaram de ser principalmente provenientes da captura extrativa, passando a serem criadas, o que tem resultado na queda dos preços e no incremento de sua comercialização (FAO, 2010).

A crescente produção de espécies a partir da aquicultura também pode ser constatada ao se avaliar o consumo dos grupos mais importantes de pescados. Na

América Latina, a aquicultura tem registrado um avanço notável. Países como Chile, Brasil, México e Equador lideraram esse avanço, com a produção de uma maior quantidade de salmão, truta, tilápia, camarões e moluscos. A aquicultura comercial na escala industrial segue dominando na América Latina. Contudo, o desenvolvimento da aquicultura em pequena escala tem possibilidades expressivas. Existem iniciativas para desenvolver este tipo de aquicultura no Amazonas, que é um dos maiores meios aquáticos do mundo com importante potencial aquícola. No Amazonas brasileiro, as famílias obtêm 30% de seus ingressos econômicos provenientes da pesca (ALMEIDA *et al*, 2002).

Aquicultura no Brasil

A aquicultura é o setor de produção de alimentos de origem animal de maior crescimento no Brasil. Em 2009, o Brasil contribuiu com 1,2 milhões de toneladas, representando 0,86% em relação à produção total mundial de pescado, ocupando assim o 18º lugar no ranking geral dos maiores produtores de pescado no mundo (FAO, 2010; MPA, 2012).

Considerando apenas os países da América Latina, o Brasil aparece em segundo lugar como produtor aquícola, atrás do Chile. O crescimento da aquicultura na América Latina nos últimos anos foi o triplo da média mundial, segundo o informe sobre o Estado Mundial da Pesca e Aquicultura de 2010, divulgada pela Organização para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2010).

O Brasil possui um expressivo potencial natural para o desenvolvimento da aquicultura, com destaques para as seguintes características: possui 7.367 km de costa; 9,0 milhões de hectares em águas represadas e em reservatórios de hidrelétricas; apresenta clima preponderantemente tropical que favorece a criação de diversas espécies aquáticas; e concentra 13,8 % da água doce superficial do mundo disponível no planeta. O País também conta com uma significativa estrutura de extração e processamento industrial com plantas pesqueiras habilitadas, segundo o conceito APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle). Considerando todos os aspectos mencionados, o Brasil tem possibilidades de chegar a ser o maior produtor de pescado do mundo (ANA & CEBDS, 2006; OSTRENSKY *et al*, 2008).

De acordo com a FAO, a produção da aquicultura no Brasil foi de 365.367 t em 2008, 415.649 t em 2009, e de 479.398 t em 2010, representando um incremento de 13,3% no período mencionado (Figura 4).

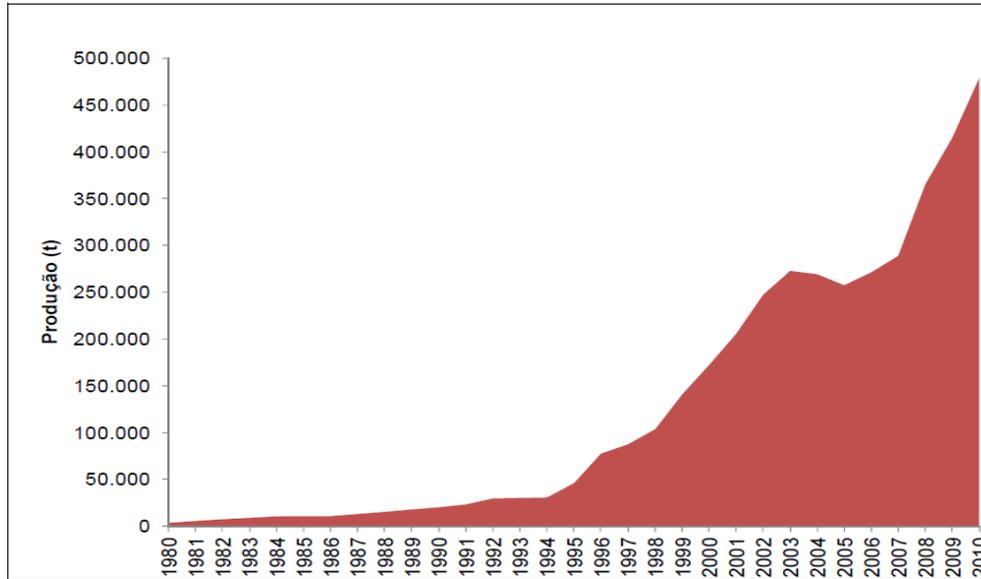


Figura 4. Produção do pescado (t) no Brasil, através da aquicultura (marinha e continental) no período de 1980-2010

Fonte: MPA, 2012

Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2012), no período de 2008 a 2010, a produção total aquícola nacional teve um incremento de 31,2%, sendo que em 2010 a piscicultura continental representou 82,3% da produção total frente aos 81,2% em 2009, e 77,2% em 2008. Já a produção aquícola de origem marinha sofreu uma redução comparando com as estatísticas dos anos anteriores (Tabela 2).

Os produtos oriundos da aquicultura brasileira constituem uma proporção cada vez maior do comércio internacional, tais como os camarões, e dentre as espécies de peixes que se destacam estão as tilápias (*Oreochromis spp.*), carpas comuns e chinesas (*C. carpio*, *C. idella*, *C. Nobilis* e *H. molitrix*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) (FAO, 2010).

A FAO recomenda o consumo de pescado como uma fonte de proteína animal de destacada qualidade. Em 2008 o consumo mundial foi de 17,1 kg/hab/ano, com projeção para 22,5 kg/hab/ano para o ano 2030, o qual representa mais de 100

milhões de toneladas/ano. Deste modo, o Brasil tem uma excelente oportunidade para a expansão da aquicultura.

Em 2010, segundo os dados fornecidos pelo MPA (2012), o consumo per capita de pescado no Brasil foi de 9,75 kg/hab/ano, apresentando um crescimento de 8% em relação ao ano anterior (Figura 5).

Tabela 2. Produção da aquicultura no Brasil (marinha e continental), para os anos 2008, 2009 e 2010

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

Fonte: MPA, 2012

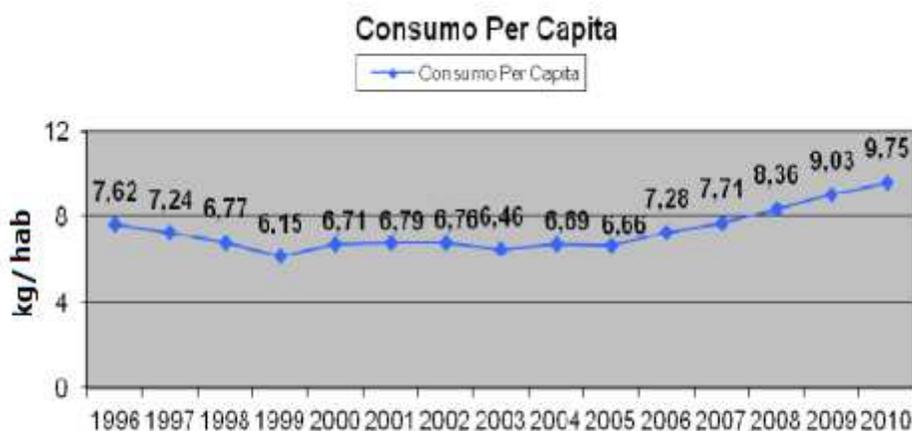


Figura 5. Consumo per capita brasileiro para o período de 1996 a 2010

Fonte: MPA, 2012

Segundo as informações fornecidas pelo MPA a respeito das espécies mais cultivadas na aquicultura continental brasileira, verifica-se que a tilápia tem a participação mais importante, com 42,61%, seguida da carpa (25,93%), salientando que estas espécies são exóticas. Dentre as espécies nativas de maior importância estão o tambaqui (14,89%) e pacu (5,82%) (Figura 6).

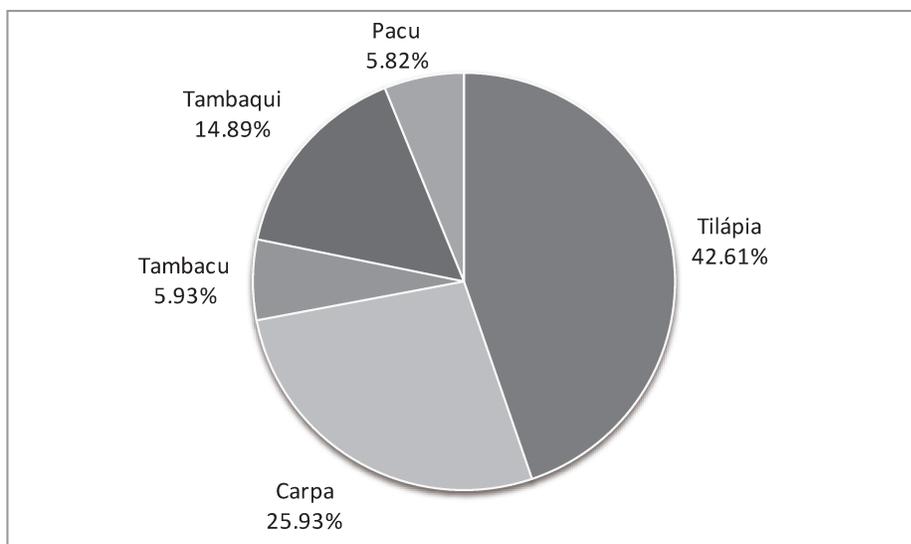


Figura 6. Participação percentual das espécies de peixes na aquicultura continental brasileira em 2010

Fonte: adaptado do Boletim Estatístico do MPA, 2012

Dentre as espécies exóticas introduzidas no Brasil pode-se mencionar a tilápia, a carpa, a truta e o bagre americano (peixe-gato), as quais possuem algumas vantagens sobre as espécies nativas com relação ao conhecimento técnico disponível e a biologia. Sem dúvida, de todas as espécies criadas na piscicultura, a tilápia possui um maior destaque, sendo considerada a espécie mais importante do século XXI, com criação em mais de 100 países (FITZSIMMONS, 2000).

Tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*)

A criação de tilápias, denominada de tilapicultura, se iniciou como uma atividade de subsistência, expandindo-se durante a segunda metade do século XX. As tilápias são naturais da África e Oriente Médio, tiveram uma distribuição expandida nos anos cinquenta para América do Norte, América Latina e Europa (STICKNEY, 2000; ROMANA-ERGUIA *et al*, 2004).

A tilápia do nilo é um peixe de água doce que pertence à família Cichlidae, originária da África e foi introduzida no Brasil em 1954. Também é conhecida por outros nomes como tilápia nilótica, St. Peter, St. Pierre e chitralada (LOVSHIN, 1998).

As tilápias podem ser onívoras, herbívoras ou fitoplanctófagas, dependendo do gênero. Além de constituir uma ótima fonte de proteína animal, de alta qualidade, apresenta características vantajosas para sua criação como, por exemplo, boa

tolerância à baixa concentração de oxigênio e à alta concentração de amônia na água, boa conversão de proteína vegetal em animal, desova ao longo do ano, possui boa adaptabilidade em condições ambientais favoráveis, propaga-se facilmente em águas paradas e são muito resistentes. Além disso, produzem carne de textura firme, sem espinhos e alta aceitação no mercado pela sua qualidade e rendimento em filés, indicando um alto potencial para a criação e industrialização comercial, podendo atingir até cerca de 5 kg de peso vivo (MACINTOSH & LITTLE, 1995; PHELPS & POPMA, 2000).



Figura 7. Tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*)

Esta espécie de peixe constitui-se na segunda mais criada em água doce no mundo e a mais criada no País desde 2002. É criada em 24 dos 27 estados brasileiros, produzindo cerca de 150 mil toneladas (ALCESTE & JORY, 1998; LOVSHIN, 1998; BORGUETTI *et al.*, 2003; MPA, 2010).

No Brasil, atualmente, existem linhagens melhoradas das tilápias, adaptadas as condições do país, como: Tilápia Tailandesa ou Chitralada (nomeada como SUPREME TILÁPIA AQUABEL), Linhagem GIFT (*Genetic Improved Farmed Tilapia*), Linhagem GMT (Genetically Male Tilápia), Tilápia Prateada GMT e Tilápia Vermelha GMT (SCORVO *et al.*, 2010).

Com relação aos principais sistemas de criação utilizados na criação de tilápias, destacam-se os viveiros escavados e tanques-redes. A temperatura da água nos sistemas de criação pode variar de 20 a 30 °C, porém, possuem boa tolerância mesmo em temperaturas próximas a 12 °C (McANDREW & BEVERIDGE, 2000; GUERRERO, 1982).

Segundo as informações estatísticas fornecidas pelo MPA em 2010, da produção total aquícola brasileira, a tilapicultura respondeu por 45%,

(aproximadamente 155 mil toneladas). Com certeza a tilapicultura tem uma projeção de crescimento a cada ano, conforme pode ser verificado na Figura 8, na qual está apresentada a sua contínua evolução produtiva desde 1996.

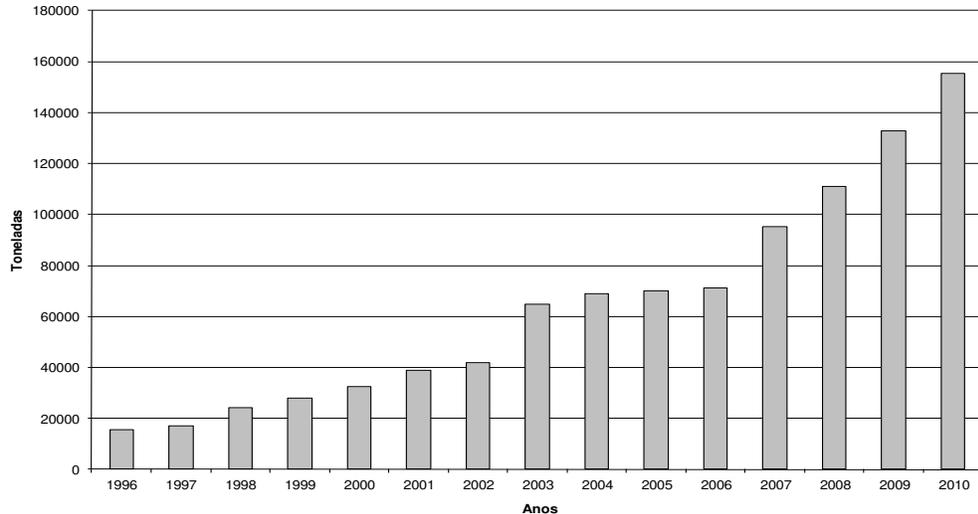


Figura 8. Evolução da criação de tilápia no Brasil

Fonte: Adaptado do IBAMA/MPA, 2010.

Segundo o MPA (2010), da produção total da piscicultura, aproximadamente 40% foram provenientes de espécies nativas. Por outro lado, existe uma grande diversidade das espécies nativas que apresentam alto potencial para a piscicultura e que ao longo dos anos estão ganhando maior importância, dentre elas destacam-se o tambaqui, o pacu, o tambacu, o piaçu, entre outros (MARTINS *et al*, 2002). Fazendo uma análise nas perspectivas atuais da produção comercial de pescado no Brasil, verifica-se claramente que o país pode chegar a ser o maior fornecedor de pescado de água doce, mediante a criação de espécies nativas, dentre as quais pode ser o pacu, já que é uma das espécies representativas da piscicultura brasileira com alto potencial de extensão produtiva (FONSECA & SILVA, 2004).

Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (HOLMBERG, 1887) pertence à sub-família dos mileíneos (NAKATANI *et al.*, 2001). Também conhecido como pacu-guaçu e pacu-caranha, apresenta cor cinza-escuro no dorso e o ventre é amarelo dourado. Possui um corpo alto, ovalado e comprimido e dentes molariformes. Pode atingir até 15 kg de

peso vivo e medir 80 cm de comprimento. É mais apreciado quando alcança os 3 kg, pois apresentam maior acúmulo de gordura conforme avança sua idade.

Por ser um peixe reofílico, em ambiente natural, migra anualmente contra as correntezas para sua reprodução. Em ambientes confinados, como nos tanques-rede ocorre bloqueio no ciclo gonadal, e se reproduz por meio de indução artificial (ROMAGOSA, 2008 e 2010).

No meio natural, alimentam-se de frutos, sementes, folhas, algas, raramente peixes, crustáceos e moluscos. As condições apropriadas para sua criação são de água com pH ligeiramente ácido e temperatura de 26 °C. É considerado um peixe nobre para o consumo humano, pelas particularidades de seus hábitos alimentares (BORGUETT & CANZI, 1993; PAI *et al*, 2000).

O sistema mais utilizado para a criação desta espécie é o viveiro escavado, mas também pode ser criada em tanques-rede. Dependendo da época do ano e da qualidade da água, possui boa produtividade e aceitação na piscicultura. Quando criado de maneira adequada e em clima favorável, pode produzir de 7 a 10 toneladas por hectare. Comporta-se bem no policultivo – criação de mais de uma espécie - desde que seja a espécie principal. Cabe ressaltar que o pacu é uma das poucas espécies produzidas nos quatro Estados da região Sudeste, sendo que na região Sul sua criação somente está concentrada no Estado do Paraná, pois as baixas temperaturas de Santa Catarina e Rio Grande do Sul podem ser letais para o seu desenvolvimento (PEZZATO & SCORVO-FILHO, 2000).

A existência de espinhas em “Y” na musculatura é um fator que limita a expansão, no entanto, hoje há cortes do tipo filé que ajudam na retirada destes espinhos (BITTENCOURT, 2008).



Figura 9. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Importância do uso de medicamentos veterinários na aquicultura

Inevitavelmente as doenças estão presentes em toda produção animal, e a aquicultura não é uma exceção. A intensificação desta atividade contribui para a disseminação de doenças em peixes, sendo que os fatores mais importantes que favorecem esta disseminação estão relacionados com o manejo inadequado e as más condições ambientais (ROBERTS & BULLOCK, 1980; SCHALCH *et al.*, 2005).

Quanto aos problemas de manejo inadequado, podem ser destacadas as altas densidades de estocagens, níveis de arraçoamento, reestocagem, nutrição inadequada. Segundo Pavanelli *et al.* (2002), as altas concentrações dos peixes facilitam a disseminação de patógenos, produzindo uma alta mortalidade dos animais. Dentre os fatores ambientais a serem considerados importantes estão a queda dos teores de oxigênio dissolvido, o aumento de gás carbônico (CO₂), amônia (NH₃), nitrito (NO₂⁻), as mudanças bruscas da temperatura, o excessivo acúmulo de material orgânico e outras alterações físico-químicas da água. Outro fator importante para ser considerado é o transporte de peixes quando é realizado de forma rápida, o que facilita a disseminação de doenças quando os cuidados de aquisição e quarentena não são respeitados (PAVANELLI *et al.*, 2002; ROTTA & QUEIROZ, 2003).

O resultado final do desequilíbrio entre patógeno, hospedeiro e ambiente são as enfermidades nos peixes (TORANZO *et al.*, 2004).

Existem vários agentes patogênicos que causam grandes prejuízos econômicos à piscicultura. Como exemplo, pode-se mencionar o caso da principal empresa produtora de tilápia da Costa Rica, Acqua Corporation, a qual teve uma perda de US\$ 2,5 milhões, como consequência de uma infecção crônica causada pela bactéria *Piscirickettsia salmonis*, que foi possivelmente agravada por alterações na qualidade da água de abastecimento.

Na Tabela 3 são apresentados os principais agentes patogênicos isolados na tilapicultura, na qual se verifica que as doenças encontradas podem ser basicamente de origem parasitária, bacteriana, viral ou fúngica, sendo que as bacterioses destacam-se por serem apontadas como os principais fatores limitadores da produtividade e, entre as mais comuns, sobresaem-se a columnariose (ou podridão de brânquias), septicemia móvel, vibrioses, estreptococcose (doença da natação espiralada), edwardsiellose e granuloma visceral; podendo serem causadas por diferentes

bactérias patogênicas, (RANZANI-PAIVA et al, 1997;; PAVANELLI, 1998; ALBINATI, 2006).

Tabela 3. Agentes patogênicos registrados na tilapicultura brasileira

PATÓGENOS	ÁGUA DOCE	ÁGUA SALGADA
Protozoários	<i>Ichthyophonus sp.</i> <i>Epistylis sp.</i> <i>Chilodonella</i> <i>Tricodinideos</i>	
Flagelados	<i>Ichthyobodo necator</i> <i>Piscinoodinium pillulare</i>	<i>Amyloodinium ocellatum</i>
Monogenóides	<i>Dactylogyrus, Gyrodactylus</i> <i>Cleidodiscus, Cichilogyrus sp.</i>	<i>Neobenedenia melleni,</i> <i>Cichilidogynus sp.</i>
Cópéodos	<i>Ergasilus spp. Argulus spp.</i> <i>Dolop spp. Lemaea spp.</i>	<i>Caligus spp.</i>
Virus	<i>Iridovírus</i>	
Bactérias	<i>Flavobacterium columnare,</i> <i>Aeromonas hydrophila, Vibrio</i> <i>spp., Streptococcus iniae,</i> <i>Streptococcus agalactiae,</i> <i>Edwardsiella tarda, Francisella</i> <i>sp., Pseudomonas fluorescens,</i> <i>Piscirickettsia salmonis,</i> <i>Plesiomonas shiguelloides</i>	<i>Streptococcus iniae, Vibrio spp.,</i> <i>Flexibacter maritimus (podridão</i> <i>das nadadeiras).</i>
Fungos	<i>Saprolegnia parasítica,</i> <i>Branchyomyceae spp.</i>	

Fonte: Adaptado de PAVANELLI et al., 1998 e ALBINATI, 2006.

Diante do exposto, verifica-se a importância da necessidade do uso de medicamentos veterinários, tais como os antimicrobianos, que ajudem no tratamento de doenças infecciosas. Os antimicrobianos, de forma geral, são utilizados com o intuito de inibir o crescimento de microorganismos. No último século, com o desenvolvimento de novos antimicrobianos, o tratamento de doenças infecciosas tem sido melhorado, reduzindo a mortalidade dos animais (MCEWEN & FEDORKA-CRAY, 2002; GOMEZ, 2011; MAZZUCHELLI & RODRÍGUEZ, 1997; FAO, 2005).

Na aquicultura, os antimicrobianos utilizados em animais destinados ao consumo humano têm as seguintes finalidades:

- **Terapêuticos:** com o objetivo de tratar animais doentes (GÓMEZ, 2011).
- **Metafilático:** utilizado quando o produtor tem certeza de que seus animais estiveram expostos a algum agente infeccioso, então os antimicrobianos são

administrados a todos os animais do lote (MAZZUCHELLI & RODRÍGUEZ, 1997).

Dentre os grupos de antimicrobianos mais utilizados na aquicultura mundial estão as penicilinas (amoxicilina, ampicilina), os fencóis (florfenicol), os macrolídeos (eritromicina), as tetraciclina (oxitetraciclina), os aminoglicosídeos (estreptomicina), as sulfonamidas, as fluoroquinolonas, entre outros (FAO, 2005; LIM & WEBSTER, 2001).

Dos antimicrobianos mencionados anteriormente, destacam-se as fluoroquinolonas por constituírem um grupo de antimicrobianos com alto espectro de ação (gram + e gram -), além de apresentar outras características que serão discutidas no próximo item.

Fluoroquinolonas

Em 1949, Price trabalhou na degradação de alcalóides e como resultado obteve o primeiro composto relacionado ao grupo de quinolonas, que se tratava de uma molécula sem atividade biológica, a qual denominou quinolona (1-metil-4-quinolon-3-carboxílico) (CAIERÃO *et al.*, 2004). A primeira quinolona utilizada de forma clínica para o tratamento de infecções urinárias foi o ácido nalidíxico, descoberto em 1962 por LESHER & COLS, sendo útil por sua atividade sobre algumas bactérias gram-negativas (RUIZ, 1999). Posteriormente, foram se desenvolvendo mais derivados com amplo espectro de ação antibacteriana: ácido oxolínico, ácido piromídico, flumequina e outros (MOELLERING 2000). Estas são conhecidas como quinolonas de primeira geração. Na década de 1980 se originaram as quinolonas de segunda geração, denominadas fluoroquinolonas (FQ). A este grupo pertencem a ciprofloxacina, danofloxacina, difloxacina, enrofloxacina, flumequina, marbofloxacina, norfloxacina, ofloxacina e sarafloxacina.

A estrutura básica das quinolonas (Figura 10) apresenta um grupo carboxílico na posição 3 e um grupo cetona na posição 4, que são necessárias para conferir a atividade antibacteriana. O flúor na posição 6 diferencia as FQ das quinolonas e contribui para a melhoria da atividade contra bactérias gram-negativas e gram-positivas. Na posição 1, a adição de um grupo ciclopropil (ex. enrofloxacina e ciprofloxacina), um grupo etila, ou um grupo fluorofenil melhora o espectro de atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. A adição de um grupo piperazinil na posição 7, como também ocorre na ciprofloxacina e enrofloxacina, melhora o espectro

de atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (RIVIERE & PAPICH, 2009). As estruturas moleculares das quinolonas a serem estudadas no presente trabalho são apresentadas na Figura 11.

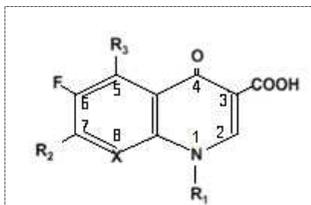


Figura 10. Estrutura Básica das Quinolonas

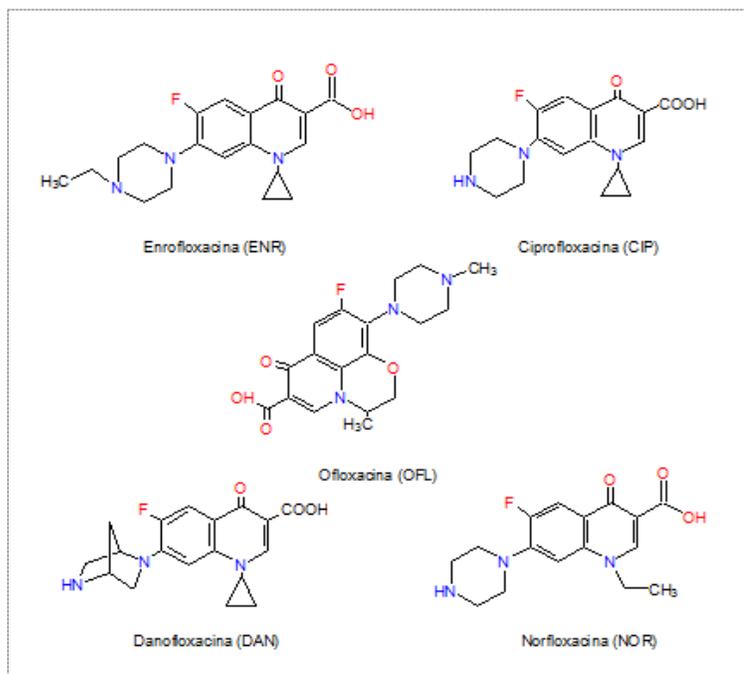


Figura 11. Estruturas moleculares de algumas fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas (FQ) apresentam um alto potencial no tratamento de doenças, já que possuem um amplo espectro de atividade contra os organismos gram-positivos e gram-negativos, tendo uma ação terapêutica em infecções causadas por microorganismos resistentes a outros medicamentos (TAVARES, 1996; SOUZA, 2005). As FQ têm sido principalmente utilizadas no tratamento de infecções respiratórias e gastrointestinais. O FDA aprovou o uso terapêutico da sarafloxacina em aves domésticas em 1995, se tornando assim, a primeira fluoroquinolona aprovada para uso em animais de produção (FDA, Fed. Reg. 60.50097, 1995).

Cabe ressaltar que as FQ são consideradas bactericidas (ou seja, produz a morte da bactéria), pois apresenta CIM (Concentração Inibitória Mínima, isto é,

concentração mínima do antibiótico que previne o crescimento bacteriano visível) e CBM (Concentração Bactericida Mínima, isto é, concentração mínima do antibiótico que mata 99,9% do número original de bactérias) com magnitudes semelhantes.

Outra característica importante das FQ é que produzem um prolongado efeito pós-antibiótico, apresentando uma liberação lenta a partir do tecido, permitindo assim a administração de uma dose única diária (BUFFÉ *et al.*, 2001). Dentre as FQ mais utilizadas na piscicultura mundial destacam-se a flumequina, a sarafloxacin e a enrofloxacin (WOO & BRUNO, 2011; MELLA *et al.*, 2000).

Consequências do uso de medicamentos veterinários na aquicultura

Como em toda produção animal, na aquicultura os medicamentos veterinários são amplamente utilizados durante a produção, principalmente para o tratamento de enfermidades bacterianas (uso terapêutico). Portanto, seu uso deve ser realizado respeitando as boas práticas veterinárias. Porém, os produtores, no intuito de evitar perdas econômicas, muitas vezes fazem uso de forma inadequada e não controlada destes, potencializando o risco da presença de resíduos dos antimicrobianos afetando a produção aquícola, o meio ambiente, e por consequência também à saúde humana (WHO, 1998; OIE, 2003; FAO/SEAFDEC/CIDA. 2000; ARTHUR *et al.*, 1996; FAO, 1997).

O uso de medicamentos veterinários na aquicultura apresenta uma ampla gama de implicações, oferecendo muitos benefícios, como por exemplo, o aumento da produtividade; desta forma, seu uso foi facilmente estendido, melhorando a questão sanitária e a biossegurança na aquicultura. No entanto, a medida em que o uso dos antimicrobianos se expande, aumenta a preocupação com o uso irresponsável por parte dos produtores, o qual produz como consequência a presença de resíduos de antimicrobianos nos produtos provenientes da aquicultura. Esses resíduos estão diretamente relacionados com a questão da resistência microbiana.

O desenvolvimento da resistência microbiana depende de algumas circunstâncias, como por exemplo, está demonstrado que as altas concentrações de Mg^{2+} (54 mmol/L) e Ca^{2+} (10 mmol/L) em águas salobras provocam redução (>90%) da atividade biológica dos antimicrobianos, tais como a oxitetraciclina e das quinolonas (flumequina e ácido oxolínico). Deste modo, a cepa bacteriana que coloniza o intestino do peixe pode ser mais sensível ou resistente a estes produtos em função do meio

aquático (doce ou salgado) onde se encontre o peixe (SMITH *et al.*, 1994; FAO/RCAAP/OMS, 1999).

A resistência microbiana tem sido identificada mediada por plasmídeos (moléculas circulares duplas de DNA capazes de se reproduzir independentemente do DNA cromossômico) que tornam a bactéria resistente a dois ou mais antimicrobianos, devido à presença de genes de resistência para diversos antimicrobianos num só plasmídeo. Atualmente já se identificaram inúmeros plasmídeos resistentes a vários antimicrobianos utilizados na aquicultura, tais como as sulfonamidas, estreptomicina, trimetoprima, entre outros (FAO/RCAAP/OMS, 1999).

O processo de produção da atividade aquícola produz contaminação gerando efeitos adversos no meio ambiente (Figura 12). Um dos impactos produzidos no meio ambiente pela presença de resíduos de medicamentos veterinários está relacionado à alteração da composição bacteriana da flora marinha e de água doce. Devido à sua toxicidade, afetam diretamente à composição do fitoplâncton, zooplâncton e até as populações de animais maiores (Boxall *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2006). Desta forma, as alterações na microbiota marinha produzida pela presença destes resíduos podem alterar a cadeia trófica (Schmidt *et al.*, 2001). É importante lembrar que o bem-estar da diversidade microbiana marinha é essencial para toda a ecosfera (Hunter-Cevera *et al.*, 2005).

Outra consequência que pode haver é a bioacumulação (quando os organismos vivos retêm dentro de si os resíduos de substâncias tóxicas, e se acumulam nos demais seres vivos da cadeia alimentar até chegar ao ser humano), produzindo assim um processo de intoxicação lenta e que muitas vezes chega ser fatal (BRAGA *et al.*, 2001).

Na aquicultura a via de administração mais frequente dos medicamentos veterinários é a oral, depois de incorporados à ração. Uma parte dos fármacos atinge o ambiente aquático decorrente do processo de lixiviação da ração não ingerida pelos peixes e pelas fezes, podendo ser posteriormente consumido por organismos detritívoros (animal heterótrofo que se alimenta de matéria orgânica morta) ou por peixes silvestres que se alimentam ao redor dos sistemas de criação (ALDERMAN *et al.*, 1994; BEVERIDGE, 1996) .

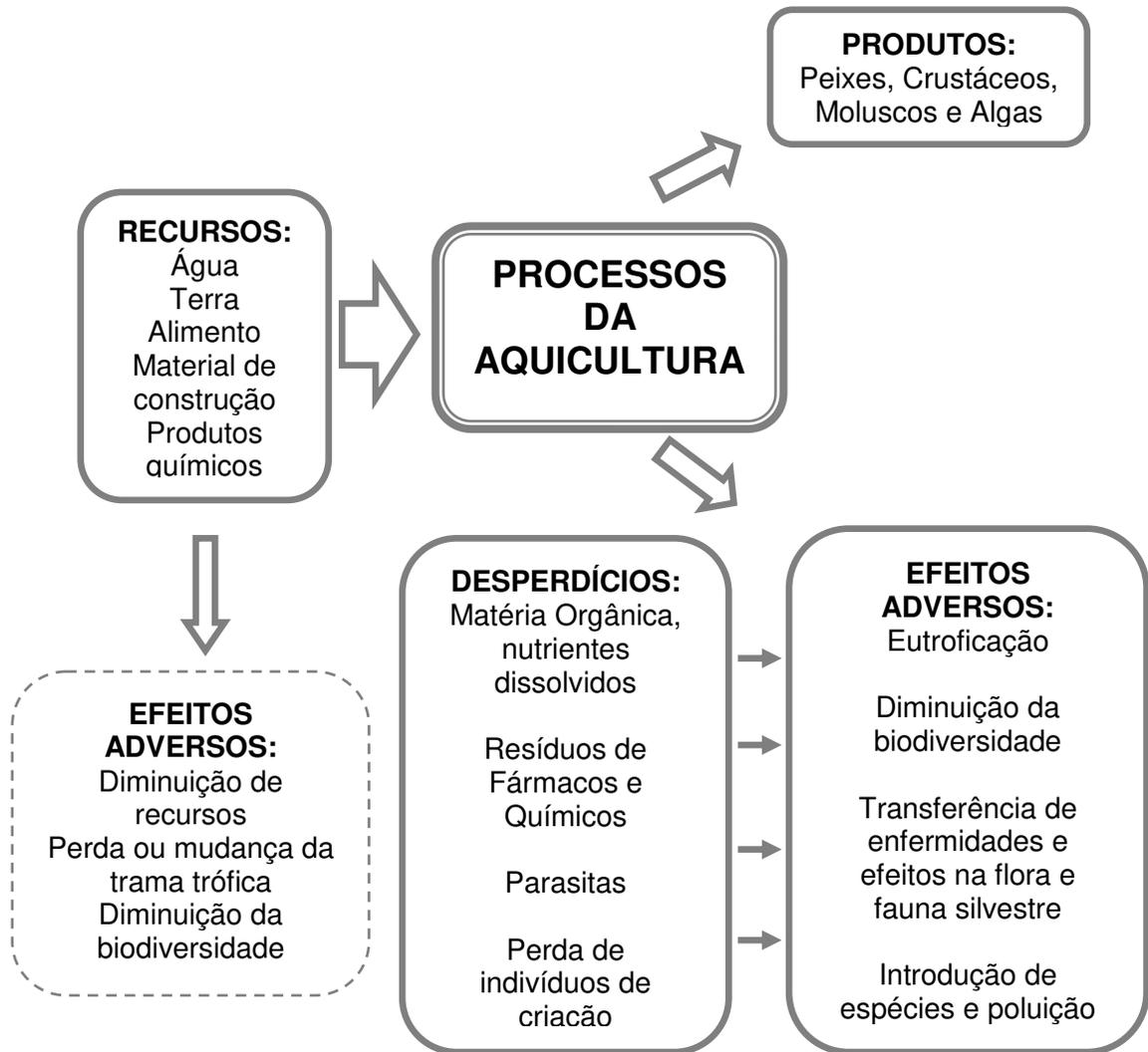


Figura 12. Fluxograma dos processos envolvidos no ciclo produtivo da aquicultura

Fonte: Adaptado de BRUSCHMANN (2001)

Muitos dos antimicrobianos que são misturados com a ração tendem a não serem absorvidos pelos peixes, sendo excretados. Dependendo do tipo de antimicrobianos utilizado, entre 60% a 85% do fármaco pode ser excretado através das fezes. Sabe-se que a persistência dos antimicrobianos nos sedimentos pode variar desde um dia a anos, por exemplo, Weston (1996) relata que a oxitetraciclina e o ácido oxolínico podem persistir nos sedimentos durante 10 e 6 meses, respectivamente (LUNESTAD, 1992; COYNE *et al.*, 1994). Atualmente, é conhecido que os antimicrobianos podem estar presentes à centenas de metros dos sistemas de criação

(mediante o ciclo hidrológico – troca contínua de água na hidrosfera, água do solo, entre outros - seria a forma mais rápida de propagação dos antimicrobianos) permanecendo no ambiente por anos (LUNESTAD, 1992; SAMUELSEN, 1992).

Foram realizados estudos para verificar se a presença de antimicrobianos nos sedimentos pode induzir alterações no ambiente. Foi demonstrado que estes compostos podem inibir os processos de redução de sulfatos assim como de nitrificação (processo de conversão de amônia a nitrato, realizada por diferentes bactérias do solo, tais como as nitrosomonas, nitrosococcus e nitrobacter). No entanto, existe pouca evidência de mudanças na microbiota e nas taxas de decomposição da matéria orgânica como consequência da presença de antimicrobianos. Vários estudos têm demonstrado um aumento da resistência de bactérias inócuas e patogênicas em locais de exploração aquícola que fizeram uso de antimicrobianos, mesmo anos depois dessa atividade ter sido interrompida (HANSEN *et al.*, 1992; KLAVER & MATHEWS, 1994; HASTINGS & McKAY, 1987; AOKI, 1992; RICHARDS *et al.*, 1992; KERRY *et al.*, 1994).

A presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos de origem animal pode causar diversos problemas à saúde humana. BRITO & PORTUGAL (2003) relataram que resíduos de cloranfenicol causam alterações na flora bacteriana intestinal, provocando a diminuição da absorção de vitaminas, e gerando problemas relacionados com a aplasia medular e síndrome cinzenta do recém-nascido. Ainda, NASCIMENTO *et al.* (2001) relataram que a presença de resíduos de penicilina no leite pode causar alergias em pessoas sensibilizadas (aproximadamente 10% da população), estando relacionadas com episódios de asma, transtornos digestivos e até a possibilidade de choque anafilático.

Com relação ao risco à saúde humana decorrente do desenvolvimento da resistência microbiana na aquicultura, a FAO/OIE/WHO (2006) ressalta dois aspectos importantes: (1) o desenvolvimento da resistência microbiana adquirida em bactérias aquáticas. Isto pode ser considerado como uma propagação direta para os seres humanos; (2) o desenvolvimento da resistência microbiana adquirida em bactérias aquáticas através de bactérias que atuam como um reservatório de genes resistentes, os quais são disseminados para bactérias patogênicas para o ser humano. Isto é considerado uma propagação indireta para os seres humanos, causada pela transferência de genes horizontalmente.

Atualmente, há evidências que indicam que os genes que medeiam esta resistência podem ser transmitidos de bactérias aquáticas a bactérias capazes de produzir infecções em humanos e em animais terrestres. Isto mostra que não existem fronteiras com relação ao fluxo de genes de resistência microbiana e que este fenômeno é global, já que o uso de antimicrobianos no ambiente apresentará repercussões em outros ambientes aparentemente distantes (SORUM, 2009; SCHMIDT *et al.*, 2001; RHODES *et al.*, 2000, CABELLO, 2004).

A FAO/RCAAP/OMS (1999) também considera a possibilidade de uma propagação direta da resistência microbiana mediante a presença de resíduos de antimicrobianos na água potável. No caso de países desenvolvidos, é remota a possibilidade de que resíduos de antimicrobianos possam chegar até o consumidor através da água potável, já que os métodos de tratamento normalmente utilizados para a água asseguram que os patógenos viáveis não cheguem até o consumidor. Entretanto, observa-se outra realidade para os países em desenvolvimento, com baixo poder aquisitivo e com déficit de alimentos, nos quais a água potável nem sempre é obtida a partir dos devidos processos de tratamento da água. Também, em alguns dos países em desenvolvimento que possuem clima tropical, existe maior possibilidade de que as bactérias patogênicas dos peixes estejam aclimatadas às temperaturas mais próximas às do corpo humano, podendo serem capazes de sobreviver no intestino das pessoas (FAO/RCAAP/OMS, 1999).

A FAO/OIE/WHO (2006) considera importante os efeitos causados pela presença de resíduos de antimicrobianos na flora intestinal humana, já que podem afetar diretamente à saúde pelos seguintes motivos: (i) exercer uma pressão seletiva sobre a flora intestinal dominante; (ii) favorecer o crescimento de microorganismos com resistência natural ou adquirida; (iii) promover direta ou indiretamente o desenvolvimento da resistência adquirida em bactérias entéricas patogênicas; (iv) prejudicar a resistência da colonização; ou (v) poder alterar a metabolização da atividade enzimática na microflora intestinal (HERNANDEZ, 2005). Embora o conhecimento disponível nesta área seja limitado, alguns estudos indicam que esses efeitos poderão acontecer num nível baixo de exposição sobre a microflora intestinal humana (FAO/OIE/WHO, 2006).

Aspectos regulatórios dos medicamentos veterinários

A FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura), a OMS (Organização Mundial da Saúde) e a OIE (Organização Internacional das Epizootias), em trabalho conjunto com os governos de diferentes países, têm focado atenção na questão do uso irresponsável dos antimicrobianos em todos os sistemas de produção animal. Assim, têm-se fortalecido os regulamentos sobre o emprego de antimicrobianos na produção aquícola (FAO, 2002).

Neste contexto, o estabelecimento e aplicação do Limite Máximo de Resíduo (LMR) para os antimicrobianos utilizados na produção animal se faz indispensável. O LMR é definido como a concentração máxima aceitável de uma substância nos tecidos comestíveis de um animal (gordura, rins, fígado, músculos, mel, leite e ovos) que, sendo ingerida pelo ser humano, não representa risco para sua saúde. São estabelecidos LMR para todos os antimicrobianos que tem seu uso aprovado em animais de produção, e são diferenciados entre as espécies animais e entre os tecidos dos mesmos. A atenção aos LMR para os antimicrobianos é de grande importância, com vista à garantia de que os alimentos que estão disponíveis no mercado sejam seguros para o consumo. O estabelecimento dos LMR visa atender a chamada Ingestão Diária Aceitável (IDA), que é definida como a quantidade de uma substância que ingerida diariamente, durante toda a vida, não provoca danos à saúde da pessoa, sendo expressa em mg/kg de massa corpórea (JECFA, 2007).

O órgão responsável na União Europeia pelo estabelecimento dos LMR para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal é o Grupo de Trabalho da Segurança de Resíduos (*Working Group on the Safety of Residues-WGSR*) pertencente ao Comitê de Produtos Veterinários Medicinais (*Committee for Veterinary Medicinal Products - CVMP*) da Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency – EMEA*).

Para o caso de substâncias proibidas ou não autorizadas nas quais não existe um valor de LMR, a Comunidade Europeia, mediante a Decisão 2002/657/EC da Comissão de 12 de Agosto de 2002, estabeleceu o Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR), o qual é estabelecido como a quantidade mínima da (s) substância (s) presente (s) na amostra a ser detectada e confirmada por um determinado método analítico (EC, 2002).

O Comitê de Peritos da FAO/WHO sobre Aditivos em Alimentos (JECFA), órgão que assessora o Codex Alimentarius, estabelece valores de IDA e LMR para fármacos veterinários utilizados na produção de alimentos de origem animal. As recomendações dadas pelo JECFA são adotadas pelo Codex Alimentarius, para garantir a segurança alimentar dos consumidores no mundo. Na Tabela 4, estão apresentados os valores de LMR estabelecidos para quinolonas utilizadas na aquicultura mundial.

Para estabelecer medidas de vigilância sanitária, diferentes países adotam as recomendações do Codex Alimentarius. Cabe ressaltar que na atualidade poucos países têm estabelecido valores de LMR para os fármacos veterinários utilizados na aquicultura.

Dentre os países ou regiões que já aprovaram antimicrobianos para uso específico na aquicultura, pode-se mencionar a Comunidade Europeia, Estados Unidos, Canadá e Noruega. Na Comunidade Europeia os antimicrobianos utilizados na aquicultura são a amoxicilina, florfenicol, flumequine, ácido oxolínico, oxitetraciclina, sarafloxacin, sulfadiazina e trimetoprim (RODGERS & FURONES, 2009). Nos Estados Unidos os antimicrobianos aprovados para a aquicultura são a oxitetraciclina, a sulfametazina e a combinação de sulfadimetoxina-ormetoprim (FDA, 2002). Na Canadá, os antimicrobianos que estão aprovados para serem utilizados na aquicultura são a oxitetraciclina, florfenicol, sulfadiazina (trimetoprim) e sulfadimetoxina (ormetoprim) (HC-SC, 2011). Na Noruega dentre os antimicrobianos utilizados na aquicultura estão florfenicol, sulfonamida, tetraciclina e trimetoprim (CABELLO, 2003). Os regulamentos não só autorizam os tipos de antimicrobianos que podem ser utilizados, como também especificam o tipo de espécie a que se destina, o diagnóstico, a dose e a duração do tratamento, bem como, o período de interrupção que deve ser observado entre a última administração do fármaco e o abate (período de carência), quando o antimicrobiano é utilizado como agente terapêutico. O cumprimento destas condições e regulamentos assegura que os resíduos estejam abaixo dos LMR estabelecidos e que os riscos de que bactérias patogênicas desenvolvam sua resistência sejam insignificantes ou pelo menos aceitáveis. Nos países desenvolvidos (CE, EUA, Canadá e Noruega), os antimicrobianos aprovados são adquiridos e utilizados somente com prescrição e orientação de um profissional qualificado (FAO, 2002).

Tabela 4. Limites Máximos de Resíduos estabelecidos para quinolonas de uso permitido na aquicultura em diferentes regiões.

REGIÃO	QUINOLONA	LMR(µg/kg)	REFERÊNCIA
Europeia	Sarafloxacina	30 ^e	Agência Europeia de Medicamentos - EMEA
	Acido oxolinico	300	
	Flumequina	600 ^e , 500 [*]	
	Danofloxacina	100	
	Difloxacina	300	
	Enrofloxacina	100	
Japão	Acido Oxolinico	100 ^a , 60 ^b , 50 ^c	Fundação de Pesquisa Química de Alimentos do Japão – FFQR
	Flumequina	500 ^a , 40 ^b , 600 ^c	
	Danofloxacina	100 ^b , 100 ^c	
	Sarafloxacina	100, 30 ^a	
Ásia	Acido Oxolinico	50	Serviço Asiático de Regulação e Informação de Alimentos - AFRIS
	Flumequina	500	
	Enrofloxacina	100	
Chile	Acido Oxolinico	100	Serviço de Agricultura e Pecuária – SAG (Servicio Agrícola y Ganadero)
	Flumequina	600	
Equador	Enrofloxacina	100	Instituto Nacional da Pesca - INP
	Acido oxolinico	100	
	Danofloxacina	100	
	Flumequina	200	

a: Salmão e truta; b:Bonito, carapau, cavala, robalo, pargo e atum; c:Outros peixes; d:Trutas; e: Salmão

O Brasil, como membro do Codex Alimentarius, também adota valores de LMR para fármacos utilizados na produção de alimentos de origem animal. No intuito de garantir a segurança alimentar e para fins de fiscalização, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB), oficializado pela Instrução Normativa nº 42, de 20 de Dezembro de 1999 (PNCRB, 1999). Este plano é responsável por monitorar a presença de resíduos de compostos de uso veterinário e contaminantes ambientais em produtos de origem animal.

Em 2003 foi criado o Programa Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet), sob a coordenação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde. Este

programa visa controlar a presença de resíduos de fármacos veterinários em alimentos de origem animal expostos ao consumidor. No entanto, ainda não está bem desenvolvido tanto quanto o PNCRB instituído pelo MAPA para análises de produtos oriundos da aquicultura.

O PNCRB (2006) foi ampliado mediante a Portaria Ministerial nº 50, de 20 de Fevereiro de 2006, onde são detalhados os Programas Setoriais para Carne (PNCRC), Mel (PNCRM), Leite (PNCRL), Pescado (PNCRP) e Ovos (PNCRO).

A Instrução Normativa nº 9, de 30 de Março de 2007, dá início ao controle de resíduos em peixe, sendo as substâncias alvo a nitrofurantoina, nitrofurazona, furazolidona, furaltadona e cloranfenicol (PNCRB, 2007). Em 2011, foi publicada a Instrução Normativa nº 24, de 09 de Agosto, para o controle de resíduos de antimicrobianos em peixes de criação, onde foi inserido o grupo das quinolonas (Tabela 5).

Tabela 5. Limites Máximos de Resíduos estabelecidos para as quinolonas, para fins de fiscalização no Brasil

ANALITO	MATRIZ	LMR (µg/kg)
Enrofloxacin	Peixe de criação	100
Ciprofloxacin		100
Sarafloxacin		30
Difloxacin		300
Acido oxolínico		100
Flumequina		600

Fonte: PNCRB (2011)

Métodos Analíticos para determinação de resíduos de quinolonas

O desenvolvimento de um método analítico para a determinação de resíduos de fármacos veterinários em alimentos é de vital importância para se garantir que os produtos sejam seguros para a saúde do consumidor. Assim, para garantir a obtenção de resultados adequados, o método deve passar por um procedimento denominado

validação analítica, que visa avaliar e comprovar se o mesmo está adequado para a análise que se pretende (PASCHOAL, 2008).

Existem diferentes órgãos que estabelecem parâmetros de validação para análise de resíduos de medicamentos veterinários. Em nível internacional estão a Comunidade Europeia (EC, 2002), a Organização das Nações Unidas para Alimentos e Agricultura (FAO, 1997), a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, 2002), a Organização Internacional para Padronização (ISO, 1993) e a Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 1996). Em nível nacional estão a Administração de Drogas e Medicamentos (FDA, 2002), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2003) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011).

O MAPA (2011) publicou um “Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos em Produtos para a Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários”, estabelecendo assim os parâmetros a serem considerados numa validação analítica objetiva, nos quais estão incluídos: linearidade, seletividade e efeito matriz, recuperação, exatidão, precisão, limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$). Em adição, são apresentados estudos de estabilidade, controle de qualidade interna de análises e inclusão de nova amostra matriz em método validado. Na Tabela 6 são apresentados os parâmetros analíticos recomendados para serem avaliados, pelos diferentes órgãos ou agências.

Com relação à análise de resíduos em carne de peixe deve-se considerar o preparo da amostra, etapa que antecipa a análise instrumental. Os alimentos, de uma forma geral, constituem-se em matrizes complexas contendo importantes interferentes como carboidratos, proteínas, lipídeos, entre outros.

Para o desenvolvimento do preparo de amostra, deve-se levar em consideração o tipo de matriz de trabalho e as características físico-químicas dos analitos a serem determinados, visando buscar a melhor seleção possível dos reagentes envolvidos nos processos analíticos. Também é fundamental levar em consideração os valores de LMR para se planejar e estabelecer o procedimento de validação do método (PASCHOAL, 2008).

Tabela 6. Parâmetros analíticos da validação

PARÂMETRO	DEFINIÇÃO	REFERÊNCIA
LINEARIDADE	Mede a capacidade que tem o método para demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.	MAPA (2011)
SELETIVIDADE	Mede a capacidade que tem o método para identificar e/ou quantificar o analito, apesar da presença de possíveis interferentes (impurezas, metabólitos, e outros).	IUPAC (2002)
EFEITO MATRIZ	É um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas por elementos diversos que compõem a matriz amostral gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal de emissão.	MAPA (2011)
PRECISÃO	Mede o grau de concordância de resultados de testes independentes obtidos sob condições estabelecidas.	IUPAC (2002)
LIMITE DE DECISÃO (CC α)	É definida como o menor nível de concentração no qual o método pode discriminar com uma certeza estatística de $1 - \alpha$ que o analito em questão está presente.	EC (2003)
CAPACIDADE DE DETECÇÃO (CC β)	Representa a menor quantidade da substância que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada numa amostra com probabilidade de erro aceitável (β).	EC (2003)
LIMITE DE DETECÇÃO (*)	É definida como a menor quantidade do analito na amostra que pode ser diferenciada, de forma confiável, do ruído de fundo.	ANVISA (2003)
LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (*)	É definida como a menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas.	IUPAC (2002)
EXATIDÃO	Mede a proximidade dos resultados obtidos pelo método desenvolvido em relação ao valor verdadeiro, utilizando um procedimento experimental para uma só amostra por repetidas vezes.	IUPAC (2002)

(*) Parâmetros não considerados pelo MAPA.

As etapas que envolvem o preparo da amostra geralmente são: a extração do(s) analito(s) de interesse da matriz, mediante extração sólido-líquido e/ou líquido-líquido, limpeza do extrato (*clean-up*) e concentração do(s) analito(s). Para isto é importante conhecer as características químicas e físico-químicas do (s) analito (s) de interesse. No caso das quinolonas, esses compostos apresentam boa solubilidade em solventes orgânicos polares e são insolúveis em solventes apolares (como exemplo, hexano e tolueno). Portanto, a extração das quinolonas de matrizes biológicas pode ser feita utilizando solventes orgânicos de média - alta polaridade, solução tampão aquosa e um solvente orgânico não miscível, misturas de soluções aquosas-orgânicas e também soluções aquosas tamponadas (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

Com referência aos procedimentos de limpeza do extrato para a determinação de quinolonas em peixes, a literatura menciona técnicas tais como: extração em fase sólida (SPE), extração dispersiva em fase sólida (DSPE), extração pelo método QuEChERS (Rápido, Fácil, Econômico, Efetivo, Robusto e Seguro), entre outros. A concentração do(s) analito(s) pode ser feita por rota-*evaporação*, *evaporação por corrente de nitrogênio* (55 °C), entre outros procedimentos que ajudem na diminuição do volume final do extrato obtido para, assim, melhorar a detectabilidade do método.

A literatura relata diferentes métodos de determinação de quinolonas em peixes, dentre os quais, se destaca o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a diferentes sistemas de detecção (RUBIES *et al.*, 2007).

Na técnica de HPLC, as colunas analíticas mais utilizadas para a separação cromatográfica são as de fase reversa à base de sílica (C₁₈ e C₈), porém, a presença de grupos silanóis residuais e impurezas metálicas dos materiais de recheio, podem afetar na simetria dos picos cromatográficos. Para solucionar o problema de cauda dos picos cromatográficos, são utilizadas colunas capeadas (*endcapped*) ou de sílica de alta pureza (Inertsil, Kromasil, Zorbax RX, XTERRA, etc.) (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

Com relação às fases móveis recomendadas na literatura, quando se usa fase estacionária do tipo reversa para determinar quinolonas, é apontado o uso de ACN ou MeOH, ou mistura de ambos, com soluções aquosas (STUBBINGS & BIGWOOD, 2009).

As técnicas de detecção mais utilizadas em associação à cromatografia líquida têm sido as espectroscópicas (absorção na região do UV e fluorescência (FL)) e a

espectrometria de massas (MS). A absorção UV foi a mais empregada na determinação de quinolonas nas primeiras pesquisas. Porém, comparada com o sistema de detecção por fluorescência, apresenta menor seletividade e detectabilidade.

Com relação às análises de quantificação e confirmação da identidade dos analitos nas análises de resíduos de antimicrobianos em amostras de alimento de origem animal, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é a técnica mais recomendada pela União Europeia (2002/657/EC). Um parâmetro importante a considerar quando se trabalha com espectrometria de massas é o efeito matriz, já que este pode causar a supressão iônica, afetando a ionização dos analitos. Ainda assim, a espectrometria de massas é seletiva e altamente sensível, sendo a técnica mais utilizada nos estudos de confirmação da identidade de fármacos veterinários cujos resíduos estejam presentes em alimentos (JOHNSTON *et al.*, 2002).

Na espectrometria de massas existem diferentes tipos de analisadores de massas, sendo que os mais comumente utilizados na análise de resíduos de medicamentos veterinários são o triploquadrupolo (QqQ) e o tempo de voo (*time of flight*). O tipo de analisador de massas por tempo de voo (ToF) oferece excelentes resultados devido a medição de massas exatas dos analitos, tornando-se assim uma ótima ferramenta para métodos confirmatórios de identidade de fármacos (POZO *et al.*, 2006).

Alguns dos trabalhos publicados na literatura que determinaram (fluoro) quinolonas em peixes estão resumidos na Tabela 7, na qual são apresentados principais procedimentos de preparo da amostra para a extração das quinolonas em peixes e os métodos analíticos baseado em técnicas cromatográficas.

Tabela 7. Procedimentos para determinação de quinolonas em peixes por técnicas cromatográficas.

Analitos	Extração	Recuperação (%)	Separação FE / FM	Det.	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Referência
FLU, OXO	Hexano, Tampão pH 10, H ₃ PO ₄ , Na ₂ SO ₄ , NaOH	73 - 86	RP (150 x 4,6 mm, 5 µm) / KH ₂ PO ₄ -H ₃ PO ₄ - ACN – THF / Isocratico (%): 55 : 26,5 : 18, 5	FL	2	5	Malvisi <i>et al.</i> (1997)
SAR, OXO, FL	MeOH, NaOH, Tampão pH 9,0	60 - 71	RP (150 x 4,6 mm, 5 µm) / ACN -H ₃ PO ₄ / Gradiente (%) : 20 : 45; 45 : 0; 45 : 20; 0 : 20.	FL	2; 5; 7	15; 75; 75	Roudaut & Yorke (2002)
OXO, FLU, PIR, CIP, ENR, DAN, SAR, ORBI	ACN (SPE)	60 - 80	C ₁₈ (150 x 2,1 mm, 5 µm) / 2% Ac. Fórmico, ACN, Água Mili-Q / Gradiente (%) : 10 : 20 : 70; 10 : 55 : 35.	QqQ	1 - 3	5	Johnston <i>et al.</i> (2002)
OXO	Acetato Etilico	70-78	C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm)/ 0,1% ATFA, MeOH - ACN (3 : 2, v/v) / Isocratico (%): 50 : 50.	FL	2	5	Tyrpenou & Rigos (2004)
ENR, CIP, FL	Tampão pH 9,1, ACN	62 -78	RP(150 x 4,6 mm, 5 µm) / 0,02 mmol/L H ₃ PO ₄ , ACN, THF/ Gradiente (%) : 85 : 15 : 0; 72 : 16 : 12.	FL	1	-	Kirbis <i>et al.</i> (2005)
CIP, DAN, SAR, ENR, OXO, NAL, FL	NaOH 0,1 mmol/L, NaCl	95 - 116	C ₈ (250 x 4, mm, 5 µm)/ 0,4 mmol/L Ac. Citrico, MeOH, ACN / Isocratico (%): 87 : 9 : 4.	QqQ	2 - 2,7	6 - 8	Samanidou <i>et al.</i> (2008)
SAR, ENR, CIP, OXO, FL, NAL	QuEChERS, (DSPE -com sorvente PSA)	38 – 90	C ₁₈ (100 mm x 2 mm, 2,5 µm) / 0,1% Ac. Fórmico : água, 0,1% Ac. Fórmico : ACN, 0,1% Ac. Fórmico : MeOH / Gradiente (%) : 100 : 0 : 0; 75 : 25 : 0, 5 : 25 : 70, 0 : 25 : 75, 100 : 0 : 0.	QqQ	3	-	Stubbings & Bigwood (2009)
CIP, DAN, ENR, SAR, DIF, OXO, FLU	5 mL acetona (SPME)	81-113	C ₁₈ (250 x 2,0 mm, 5 µm)/ 0,3 % Ac. Fórmico, ACN / Gradiente (%) : 80 : 20; 65 : 35, 20 : 80, 15 : 85, 80 : 20.	QToF	0,2 – 1,0	0,6 – 3,3	Ming-Ming <i>et al.</i> (2009)
DIF, ENR, FL, OXO, SAR	SDS, TEA pH 3	96 -106	C ₁₈ (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) / 0,065 mmol/L SDS (0,5 % TEA), 12,5 % Propanol (0,5 % TEA), / Gradiente (% , v/v) : 0,05 / 2,5; 0,05 / 12,5; 0,1 / 7,5; 0,15 / 2,5 e 0,15 / 12,5.	MLC	10 - 70	5 - 30	Rambla-Alegre <i>et al.</i> (2010)

CIP, SAR, DAN, ENR, DIF	ACN, Tampão: 0,1 mmol/L citrato, 100 mmol/L cloreto de Mg, pH 5,0 com NH ₄ OH (SPE)	77 - 91	XDB-fenil (150 x 3,0 mm, 5 µm) / Tampão: 0,1 M malonato, 50 mmol/L cloreto de Mg, pH 6,5 com NH ₄ OH – MeOH / Gradiente (%) : 80 : 20 : 60; 40 : 20 : 80. 80 : 20.	FL	-	0,15 – 1,5	Schneider <i>et al.</i> (2007)
CIP, SAR, ENR, DIF	Ac. Acético, Etanol, Metanol, (SPE)	-	Inertsil-fenil (250 x 2,0 mm, 5 µm)/ 2% Ac. Fórmico, ACN / Isocratico (%): 86 : 14.	IT-ToF	-	5	Turnipseed <i>et al.</i> (2003)
CIP, DAN, SAR, ENR, OXO, NOR, FL, NAL	ACN, SPE	57 - 87	XDBC C ₁₈ (150 x 3 mm, 3 µm)/ 0,1% Ac. Fórmico, ACN, MeOH / Gradiente (%) : 83 : 15 : 2; 78 : 20 : 2, 63 : 35 : 2, 58 : 40 : 2, 83 : 15 : 2.	FL	-	-	Stoilova (2008)
CIP, DAN, SAR, ENR, OXO, FL	Ac. Tricloroacético, MeOH, SPE	89 - 111	XTerra-A C ₁₈ (150 x 2,1 mm, 5 µm) / 0,1% Ac. Acético – ACN: 0,1% Ac. Acético / Gradiente (%) : 100 : 0, 50 : 50, 100 : 0.	LC-QToF	4 - 6	14 - 21	Paschoal <i>et al.</i> (2009)
CIP, DAN, SAR, ENR, OXO, DIF, NAL, FL, NOR, MARBO, LOME	MeOH, Etil-Acetato, ACN, SPE	88 - 119	C ₁₈ (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)/ 0,1% Ac. Fórmico, ACN : 0,1% Ac. Fórmico (9:1) / Gradiente (%) : 100 : 0, 60 : 40, 0 : 100.	LC-QToF	-	-	Peters <i>et al.</i> (2009)
OXO, FL	Microextração com cartucho de PTFE	90 - 102	C ₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) / 0,01 mmol/L Ac. Oxálico, ACN : MeOH (75 : 25, v/v) / Isocratico (%): 55 : 45.	FL	1- 6,6	6,5 -22	Costi <i>et al.</i> (2010)
DAN, ENR, SAR, DIF, OXO, FLU, NAL, CINO, ENO, GATI, ORBI, LOME, FLERO, PEFLO, MARBO,	Extração acelerada por solvente, SPE	73 - 99	Hypersil Golden (150 x 2,1 mm, 5 µm)/ MeOH, ACN, 0,03 mmol/L Acetato de Amônia / Gradiente (%) : 10 : 10 : 80; 11 : 13 : 76, 10 : 30 : 60.	QqQ	0,3	1	Yu <i>et al.</i> (2012)

Onde: NAL: Ác. Nalidixico; FL: Flumequina; OXO: Ác. Oxolínico; SAR: Sarafloxacina; ENR: Enrofloxacina; CIP: Ciprofloxacina; DIF: Difloxacina; ORBI: Orbifloxacina; PIR: Ac. Piromidico; CINO: Cinoxacina; ENO: Enoxacina; GATI: Gatifloxacina; ORBI: Orbifloxacina; LOME: Lomefloxacina; FLERO: Fleroxacina; PEFLO: Pefloxacina; MARBO: Marbofloxacina; FE: Fase Estacionária; FM: Fase Móvel; LOD: Limite de Detecção; Na₂SO₄: Sulfato de Sódio; EtAc : Etil Acetato; H₃PO₄: Ác. Fosfórico; NaOH: Hidróxido de Sódio; DSPE: Extração dispersiva em fase sólida; PSA: Amina Secundaria Primária; QuEChERS: QUick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe; SDS: Dodecilsulfato de Sódio; TEA: Trietilamina; MeOH: Metanol; KH₂PO₄: Fosfato Monopotásico; ACN: Acetonitrila; THF: Tetraidrofurano; ATFA: Tetrafluoroaluminato de amônio; UV: Absorção na região ultravioleta; FL: Fluorescência; Det:Detecção; MLC: Cromatografia Líquida Micelar; SPME: Microextração em fase sólida; PTFE: politetrafluoretileno.

Considerações finais

A aquicultura é um sistema de produção de alimentos em crescimento no mundo todo. O Brasil possui alto potencial para a produção de peixes, tanto de espécies exóticas como de nativas. O uso de medicamentos veterinários é indispensável para incrementar a eficiência da produção aquícola. Porém, apesar da importância destas substâncias, ainda não existem suficientes medicamentos veterinários aprovados no Brasil para as diversas espécies e doenças que a aquicultura apresenta. Os medicamentos veterinários devem ser administrados de forma responsável e prudente, sempre respeitando as boas práticas veterinárias, para evitar problemas futuros na eficiência do medicamento veterinário. Dessa forma, se poderá controlar a questão da resistência microbiana, que atualmente continua sendo muito discutida pelos impactos que pode provocar, seja na produção aquícola, na saúde humana ou no meio ambiente. O método analítico é ferramenta de vital importância para assegurar que os produtos estejam enquadrados nas determinações legais. Cabe ressaltar que a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é uma técnica analítica amplamente utilizada e recomendada para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários, já que apresenta alta seletividade e detectabilidade.

REFERÊNCIAS

- AFRIS- ASIAN FOOD REGULATION INFORMATION SERVICE. Aquaculture Medical Drugs in Fish & Fishery Products, Disponível em: <<http://www.asianfoodreg.com/asia.php?pageno3=2&id=4&tab=2>>. Acessada em 26/06/2012.
- ANA & CEBDS. 2006. Agência Nacional Das Águas. Conselho Empresarial Brasileiro Para O Desenvolvimento Sustentável. Água: fatos e tendências. Brasília. 36 p.
- ALBINATI A., ALBINATI R., OLIVEIRA E., LABORDA S., VIDAL L. 2006. Edwardsiellae em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Revista Brasileira de Saúde Animal, v. 7, n. 2, p. 164-168
- ALCESTE, C. JORY, D. 1998. Análisis de las tendencias actuales en la comercialización de tilapia en los Estados Unidos de Norteamérica y la Unión Europea. In: Congreso Sul-americano de Aquicultura, p. 349-364.
- ALDERMAN D., ROSENTHAL H., SMITH, SREWART J., WESTON D. 1994. Chemical Used in Mariculture. ICES Cooperative Research Report, 202.
- ALMEIDA O., LORENZEN K., MCGRATH D. 2002. Impact of co-management agreements on the exploitation and productivity of floodplain lake fisheries in the Lower Amazon. Documento apresentado à “*Novena Conferencia Bienal de la Asociación Internacional para el Estudio de la Propiedad Común*”, p. 2-5.

- ANVISA. 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29/05/2003, Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acessada em 26/06/2012.
- AMARAL H., SATO G., STREFLING L., VAHRLICH R., HOINKES R., TEBALDI C. 2010. Aclimação do híbrido da tilápia vermelha *Oreochromis niloticus* sp. E utilização em ambientes marinhos como isca viva para a pesca de tunídeos. Revista eletrônica de Veterinária, v. 11, n. 3.
- AOKI T. 1992. Chemoterapy and drug resistance in fish farms in Japan - Diseases in Asian Aquaculture, Asian Fisheries Society, Manila, p. 519-529.
- ARTHUR C., LAVILLA-PITOGO, SUBASINGHE R. 1996. Actas de la reunión sobre el empleo de sustancias químicas en la acuicultura en Asia, Iloilo, Filipinas, p. 235.
- BEVERIDGE M. 1996. Cage Aquaculture. Second Edition. Fishing News Book, Oxford, EUA.
- BITTENCOURT, F. Cultivo de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) sob diferentes densidades em tanque-rede no reservatório de Itaipu. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, 2008.
- BORGUETTI J., CANZI C. 1993. The effect of water temperature and feeding rate on the growth rate of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) raised in cages. Aquaculture, n. 114, p. 93-101.
- BORGUETTI N., OSTRENSKY A. 2003. Aquicultura – uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba: grupo integrado de aquicultura e estudos ambientais.
- BOXALL A., FOGG L., BLACKWELL P., KAY P., PEMBERTON E., CROXFORD A. 2004. Veterinary medicines in the environment. Journal Environment Contaminants Toxicology, n.180, p. 1-91.
- BRAGA B., HESPANHOL I., CONEJO J., MIERZWA J., BARROS M., SPENCER M., PORTO M., NUCCI N., JULIANO N., EIGER S. 2001. Introdução à engenharia ambiental: o desafio do desenvolvimento sustentável. Editora PEARSON Prentice Hall, Segunda Edição, São Paulo, Brasil, p.73-127.
- BRITO J., PORTUGAL J. 2003. Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos. Embrapa Gado de Leite, Epamig/CT/ILCT, p.47-61.
- BRUSCHMANN A., 2001. Impacto Ambiental de la Acuicultura el Estado de la Investigación en Chile y en el Mundo – Un Análisis Bibliográfico de los Avances y Restricciones para una Producción Sustentable en los Sistemas Acuáticos, Terram Publicaciones, Chile.
- BUFFÉ C., ARAÚJO B., DALLA COSTA T. 2001. Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos na otimização de terapias antimicrobianas. Caderno de Farmácia. v. 17, n. 2, p. 97-109.
- CABELLO F. 2003. Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. Revista Médica Chile, n. 132, p. 1001-1006.
- CAIERÃO J. ANTUNES A., STEFENS M. MARCO M. AZEVEDO P. 2004. Novos antimicrobianos: realidade e perspectivas. Revista NewsLab, n. 66, p. 80-90.

- COSTI E., SICILIA M., RUBIO S. 2010. Supramolecular solvents in solid sample microextractions: Application to the determination of residues of oxolinic acid and flumequine in fish and shellfish. *Journal of Chromatography A*, n. 1217, p. 1447 – 1454.
- COYNE R., HINEY M., O'CONNOR B., KERRY J., CAZABON D., SMITH P. 1994. Concentration and persistence of oxytetracycline in sediments under a marine salmon farm. *Aquaculture*, n. 123, p. 31-42.
- CHRISTENSEN A., INGERSLEY F., BAUN A. 2006. Ecotoxicity of mixtures of antibiotics use in aquacultures. *Environment Toxicology Chemical*, n. 25, p. 2208-2215.
- CREPALDI D., FARIA P., TEIXEIRA E., RIBEIRO L., COSTA A., MELO D., CINTRA A., PRADO S., COSTA F., DRUMOND M., LOPES V., MORAES V. 2006. A situação da Aquicultura e da pesca no Brasil e no mundo. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v. 30, n. 3/4, p. 81-85.
- EC 2002. European Commission, Official Journal of the European Communities, 17/08/2002, L221/8-36. Disponível em: < http://ec.europa.eu/food/fs/ifsi/eupositions/ccrdvf/archives/ccrdvf_ec-comments_03_item11a_en.pdf>. Acessada: 25/07/2012.
- FAO. 1997. Towards safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture. Reports and Studies, GESAMP, n. 65, p. 40, Roma.
- FAO. 2002. Estado mundial de la pesca y la acuicultura 2002. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma. Disponível em: < <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/y7300s/y7300s00.pdf> >. Acessada em: 03/08/2012.
- FAO. 2005. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Responsible use of antibiotics in aquaculture. Disponível em: <<http://tp.fao.org/docrep/fao/009/a0282e/a0282e00.pdf> >. Acessada em: 25/07/2012.
- FAO. 2010. Estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s.pdf> >. Acessada em: 03/08/2012.
- FAO/OIE/WHO, 2006, REPORT OF A JOINT EXPERT CONSULTATION ON ANTIMICROBIAL USE IN AQUACULTURE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE, KOREA, 2006, Disponível em: < http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/aqua_jun06/en/index.html >. Acessada em: 25/07/2012.
- FAO/RCAAP/OMS. 1999. Grupo de Estudio Mixto FAO/RCAAP/OMS sobre Cuestiones de Inocuidad de los alimentos asociadas con los productos de la acuicultura, Ginebra. Disponível em: < <http://helid.digicollection.org/en/d/Jwho75s/> >, Acessada em: 10/05/2012.
- FAO/SEAFDEC/CIDA. 2000. Use of chemicals in aquaculture in Asia, Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/005/w3666e/W3666e06.htm> >, Acessada em: 25/07/2012.
- FDA. 1995. Approved Animal Drug Products, Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/animaldrugatfda/index.cfm?gb=2>. Acessada em: 25/07/2012.
- FDA. 2002. Antibiotic Drug Use in U.S. Aquaculture. Disponível em: < http://m.iatp.org/files/421_2_37397.pdf>, Acessada em: 30/07/2012.

- FITZSIMMONS, K. 2000. Tilapia: The most important aquaculture species of the 21st Century. In: SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, p. 3-8.
- FONSECA M., SILVA R. 2004. Occurrence of *Rondonia rondoni*, Travassos, 1920 (Nematoda: Atractidae) in the pacu, *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) celomatic cavity Arq.Inst. Biol., São Paulo, n. 71, p. 279.
- GOMEZ F. 2011. Uso racional de los antibióticos. Jornadas Profesionales de Avicultura – Real Escuela de Avicultura. España.
- GUERRERO R. 1982. III Control of tilapia reproduction. ICLARM Conference. Proceeding, 7. International Center for Living, Aquatic Resources Management, p. 432.
- HANSEN P., LUNESTAD B., SAMUELSEN O. 1992. Effects of oxytetracycline, oxolinic acid and flumequine on bacteria in an artificial marine fish farm sediment. Canadian Journal of Microbiology, n. 38, p. 1307-12.
- HASTINGS T., MCKAY A. 1987. Resistance of *Aeromonas salmonicida* to oxolinic acid. Aquaculture, n. 60, p. 133-41.
- HC-SC, Canadian Food Inspection Agency. Disponível em: <<http://www.inspection.gc.ca/english/fssa/fispoi/man/samnem/app1be.shtml>>. Acessada em: 25/07/2012.
- HERNANDEZ P. 2005. Responsible use of antimicrobials in aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, n. 469, FAO, Italia.
- HUNTER-CEVERA J., D. KARL, BUCKLEY M. 2005. Marine microbial diversity: The key to earth's habitability. (A report from The American Academy of Microbiology) Colloquium held April 8-10, 2005, San Francisco, CA, USA: *Marine Microbial Diversity*. Collier, R.J. et al. (eds.). Washington, DC: American Academy of Microbiology, p. 1-22.
- INSTITUTO NACIONAL DE PESCA - ECUADOR. Plan de Monitoreo de Resíduos. Disponível em: < <http://www.inp.gob.ec/acpaa/PMR.pdf>>, Acessada em: 26/06/2012.
- IUPAC. 2002. UNIÃO INTERNACIONAL DE QUÍMICA PURA E APLICADA: Compendium of Chemical Terminology – Gold Book, Disponível em: < <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf> >. Acessada em: 27/06/2012.
- JECFA. 2007. Joint Expert Committee on Food Additives. Disponível em: <http://jecfa.ilsa.org/section1.htm#1>. Acessada em: 25/07/2012.
- JOHNSTON L., MACKAY L., CROFT G., 2002. Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometric detection, Journal of Chromatography A, n. 982, p. 97-109.
- JUAN-GARCÍA A., FONT G., PICÓ Y. 2007. Determination of quinolone residues in chicken and fish by capillary electrophoresis-mass spectrometry. Electrophoresis. v. 27, p. 2240-2249.
- KERRY J., HINEY M., COYNE R., CAZABON D., NICGABHAINN S., SMITH P. 1994. Frequency and distribution of resistance to oxytetracycline in micro-organisms isolated from marine fish farm sediment s following therapeutic use of oxytetracycline. Aquaculture, n. 123, p. 43-54.
- KIRBIS A., MARINSEK J., CERKVENIL V. 2005. Introduction of the HPLC method for the determination of quinolone residues in various muscle tissues. Biomedic Chromatography. n, 19, p. 259-265.

- KLAVER A., MATHEWS R. 1994. Effects of oxytetracycline on nitrification in a model aquatic system. *Aquaculture*, n. 123, p. 237-247.
- LIM C., WEBSTER C. 2001. *Nutrition and Fish Health*, Editora: Taylor & Francis, Editores: Lim C., Webster C. Brady Y., Primeira edição, Portland, EUA, p. 13.
- LOVSHIN L. 1998. Red tilapia or Nile tilapia: which is the best culture fish? Em: *Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Peixes*, p.179-198.
- LUNESTAD B. 1992. Fate and effects of antibacterial agents in aquatic environments. Em: *Problems of Chemoteraphy in Aquaculture: From Theory to Reality* (C.M. Michel & D.J. Alderman, ed.), Office International de Epizooties, Paris, p. 152-61.
- MACINTOSH D., LITTLE D., C. 1995. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: N.R. BROMAGE & R. J. ROBERTS (eds.). *Broodstock management and egg and larval quality*. Oxford: Blackwell Science, p.277-320.
- MAPA. 2011. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Guia%20de%20valida%C3%A7%C3%A3o%20e%20controle%20de%20qualidade%20analitica.pdf>, Acessada em: 30/07/2012.
- MALVISI J., DELLA ROCCA G., ANFOSSI P., GIORGETTI, 1997. Tissue distribution and depletion of flumequine after in-feed administration in sea bream (*Sparus aurata*), *Aquaculture*, n. 157, p. 197-204.
- MARTINS M., ONAKA E., MORAES M., BOZZO F., PAIVA A., GONÇALVES A. 2002. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the state of São Paulo, Brazil. *Acta Scient.*, n. 24, p. 981-985.
- MAZZUCHELLI F., RODRÍGUEZ M. 1997. Lineas generales para la terapéutica y la profilaxis de los procesos respiratorios bovinos, *Revista de Medicina Veterinaria*, n.17, v. 10, p.46-50.
- MELLA S., ACUÑA G., MUÑOZ M., PEREZ C., LABARCA J., GONZALES G., BELLO H., DOMINGUEZ M., ZEMELMAN R. 2000. Quinolones: General characteristics of structure and classification. *Revista Chilena Infectología*, v. 17, n. 1, p. 53-66.
- McANDREW B., BEVERIDGE M. 2000. *Tilapias: biology and exploitation*. Inglaterra: Kluwer Academic Publishers, p. 1-32.
- MCEWEN S., FEDORKA-CRAY Y., P.J. 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical Infection Diseases*, v. 34, n. 3, p. 93-106.
- MING-MING Z., GE-DENG R., YU-QI F., 2009. Evaluating polymer monolith in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of quinolone antibacterials in edible animal food. *Journal of Chromatography A*, n. 1216, p. 7510-7519.
- MOELLERING R., 2000. *Principles of anti-infective therapy*. Editora Churchill Livingstone, Virginia, EUA p. 223-235.
- MPA 2012. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2010. Brasília.

- NASCIMENTO G., MAESTRO V., CAMPOS M. 2001. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba-SP. *Revista de Nutrição*, n. 2, p. 119-124.
- NAKATANI K., AGOSTINHO A., BAUMGARTNER G. 2001. *Ovos e Larvas de Peixes de Água Doce*. EDUEM: Maringá, PR, p. 378.
- OCDE-FAO. 2011. *Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos – Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Perspectivas Agrícolas 2011-2020*, p. 173-184.
- OIE. 2003. *Organização Internacional das Epizootias. Manual de Testes Diagnósticos para Animais Aquáticos*. Francia. Disponível em: <<http://www.oie.int/doc/ged/D6505.PDF>>. Acessada em: 05/04/2012.
- OSTRENSKY A., BORGHETTI J., SOTO D. 2008. *Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer*. Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca, Brasília.
- PAI V., PAI-SILVA E., CARVALHO C., FUJIHARA E., GREGÓRIO P., CURI. 2000. Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of the pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). *Anat. Histol. Embryol*, n. 29, p. 283-289.
- PASCHOAL J., RATH S., AIROLDI F., REYES F. 2008. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1190-1198.
- PASCHOAL J., REYES F., RATH S. 2009. Determination of quinolone residues in tilapias (*Oreochromis niloticus*) by HPLC/FLD and LC-MS/MS QToF. *Food Additives & Contaminants: Part A*, n. 26, p.1331–1340.
- PAVANELLI G., EIRAS L., TAKAEMOTO R. 2002. *Doenças em peixes: Profilaxia, diagnóstico e tratamento*. 2 ed. Maringá, Eduem, p. 305.
- PETERS R., BOLCK Y., RUTGERS P., STOLKER A., NIELEN M., 2009. Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, n. 1216, p. 8206-8216.
- PEZZATO L., SCORVO-FILHO J. 2000. Situação atual da aquicultura na região sudeste. In: VALENTIN, W. C., POLI, C. R., PEREIRA, J. A., BORGHETTI (Ed.) *Aquicultura no Brasil: Bases para um desenvolvimento sustentável*. CNPq: Brasília, DF, p.303-322.
- PHELPS R., POPMA T. 2000. Sex Reversal of Tilapia. In: COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J. E. (eds.). *Tilapia Aquaculture in the Americas*, v.2. Louisiana: The World Aquaculture Society, p.34-59.
- PNCRB. 1999. Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 42, de 20 de Dezembro de 1999. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16717> .>, Acessada em: 03/08/2012.
- PNCRB. 2006. Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal. Portaria Ministerial nº 50, de 20 de Fevereiro de 2006. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/PORTARIA%2050%202006.pdf>, Acessada em: 03/08/2012.

- PNCRB. 2007. Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 9, de 30 de Março de 2007. Disponível em: [http : www.avimig.com.br/galeria_imagens/LEGISLACAO_23062008_235245.pdf](http://www.avimig.com.br/galeria_imagens/LEGISLACAO_23062008_235245.pdf)., Acessada em: 03/08/2012.
- PNCRB. 2011. Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 24, de 09 de Agosto de 2011. Disponível em: < http://www.abccam.com.br/abcc/images/stories/legislacao/IN_N_24_-_MAPA.pdf >, Acessada em: 03/08/2012.
- POZO O., GUERRERO C., SANCHO J., IBÁÑEZ M., PITARCH E., HOGENDOORN E., HERNÁNDEZ F. 2006. "Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry" *Journal of Chromatography A*, n. 1103, p. 83-93.
- RAMBLA-ALEGRE M., PERIS-VICENTE J., ESTEVE-ROMERO J., CARDA-BROCH S., 2010. Analysis of selected veterinary antibiotics in fish by micellar liquid chromatography with fluorescence detection and validation in accordance with regulation 2002/657/EC, *Food Chemistry*, n. 123, p. 1294-1302.
- RANZANI-PAIVA M., ISHIKAWA C., CAMPOS B. 1997. Hematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus*, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira Zoologia*, v.14, p.329-339.
- RICHARDS R., INGLIS V., FRERICHS G., MILLAR S. 1992. Variation in antibiotic resistance patterns of *Aeromonas salmonicida* isolated from Atlantic salmon. *Salmo salar* L. in Scotland. En: *Problems of Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality* (C.M. Michel & D.J. Alderman, ed.).Office International de Epizooties, Paris, p. 276-87.
- RHODES G., HUYS G., SWINGS J., MC GANN P., HINEY M., SMITH P. 2000. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Appl Environ Microbiol*, n. 66, p. 3883-90.
- RIVIERE J., PAPICH M. 2009. *Veterinary Pharmacology & Therapeutics*. 9na Ed. USA. p.1984.
- ROBERTS R., BULLOCK A. 1980. The skin surface ecosystem of teleost fishes. *Proceedings of the Royal Society Edimburg*, n. 79, p. 87-91.
- RODGERS C., FURONES M. 2009. Antimicrobial agents in aquaculture: Practice, needs and issues. *The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture*, n. 86, p. 41-59.
- ROMANA-EGUIA M. 2004. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture*, v. 236, n. 1/4, p. 131-150.
- ROMAGOSA E. 2008. Avanços nas técnicas de reprodução de peixes migradores. In: CYRINO, J.E.P.; FURUYA, W.M.; RIBEIRO, R.P.; FILHO, J.D.S. (Ed.). *Tópicos especiais em Biologia Aquática e Aquicultura III*. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática – Aquabio: Jaboticabal, SP, p.1-16.
- ROMAGOSA E. 2010. Reproductive status in females of the brazilian catfish, *Pseudoplatystoma fasciatum* reared in cages. *Journal of Applied Ichthyology*, v.26, p. 806-81.

- ROTTA A., QUEIROZ F. 2003. Boas práticas de manejo (BPMs) para a produção de peixes em tanques-redes. EMBRAPA Série Documentos, n.47. Corumbá (MS). p. 27.
- ROUDAUT B., YORKE J. 2002. High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the screening and quantification of oxolinic acid, flumequine and sarafloxacin in fish. *Journal of Chromatography B*, n. 780, p. 481-485.
- RUBIES A., VAQUERIZO R., CENTRICH F., COMPAÑÓ R., GRANADOS M., PRAT M. 2007. Validation of a method for the analysis of quinolones residues in bovine muscle by liquid chromatography with electrospray ionisation .tandem spectrometry detection. *TALANTA*. 269-276.
- RUIZ M., RUIZ A. 1999. Consumo de quinolonas en el medio extra-hospitalario en España. *Boletín Epidemiológico Semanal, Ministerio de Sanidad y Consumo*. p. 265-272.
- SAG – SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO DE CHILE. Manual de Buenas Prácticas en el uso de antibióticos y antiparasitarios en la Salmonicultura Chilena, Disponível em: < http://www.aqua.cl/files/cab28a_Manual.pdf>, Acessada em: 26/06/2012.
- SAMANIDOU V., EVAGGELOPOULOU E., TRÖTZMÜLLER M., GUOB X., LANKMAYR E. 2008. Multi-residue determination of seven quinolones antibiotics in gilthead seabream using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1203, n. 2, p. 115-123.
- SAMUELSEN O. 1992. The fate of antibiotics/ chemotherapeutics in marine aquaculture sediments. En: *Problems of Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality* (C.M. Michel & D.J. Alderman, ed.). Office International de Epizooties, Paris, p. 162-173.
- SCHALCH S., BELO M., SOARES V.,MORAES J., MORAES F. 2005. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. *Acta Scient.*, Maringá, n. 27, v.2, p.297-302.
- SCHMIDT AS, BRUUN MS, DALSGAARD I, LARSEN JL. 2001. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Appl Environ Microbiol*, n. 67, p. 5675 – 5682.
- SCHNEIDER M., DARWISH A., FREEMAN D. 2007. Simultaneous multiresidue determination of tetracyclines and fluoroquinolones in catfish muscle using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Chimica Acta*, n. 586, p. 269 – 274.
- SCORVO J., FRASCÁ-SCORVO C., CORDEIRO J., RINALDI F. 2010. A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39. p. 112-118.
- SMITH P., HINEY M., SAMUELSEN O. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annual review of fish diseases*, n. 4, p. 273-313.
- SORUM H. 2009. Mobile drug resistance genes among fish bacteria. *APMIS Acta*, n. 637, p. 68 – 78.
- SOUZA M. 2005. New fluoroquinolones: A class of potent antibiotics. *Minireviews in Medicinal Chemistry*, v. 5 p. 1019-1017.

- STICKNEY R. 2000. Status of Research on Tilapia. *In*: COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. *Tilapia Aquaculture in the Americas*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, v. 2, p. 21-23.
- STOILOVA N. 2008. Determination of quinolones in fish tissues with high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, n 43, v. 4, p. 423-426.
- STOLKER A., BRINKMAN U. 2005. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. *Journal of Chromatography A*, v.1067. p.15-53.
- STUBBINGS G., BIGWOOD T. 2009. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Analytica Chimica Acta*, n. 637, p. 68-78.
- TAVARES W. 1996. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos. 2ªed, Brazil.
- TORANZO A., BARJA J., DOPAZO C., ROMALDE J. 2004. Enfermedades Bacterianas y víricas de peces marinos. *IN*: RANZANI-PAIVA M., TAKAEMOTO R., LIZAMA M., *Sanidade de Organismos Aquáticos*, São Paulo: Livraria Varela, p. 2-49.
- TORRES C., ZARAZAGA M. 2002. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales: ¿Vamos por el buen camino?. *Gaceta Sanitaria* . vol.16, n.2 España.
- TURNIPSEED S., ROYBAL J., PFENNING A., KIJAK P. 2003. Use of ion-trap liquid chromatography – mass spectrometry to screen and confirm drug residues in aquaculture products. *Analytical Chimica Acta*, n. 483, p. 373-386.
- TYRPENOU, A.E.; RIGOS, G. 2004. Determination of oxolinic acid residues in gilthead seabream (*Sparus aurata*) muscle tissue and plasma by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, v.60, p.657-661.
- WESTON D. 1996. Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture. *En*: *Aquaculture and Water Resources Management* (D.J. Baird, M.C. Beveridge, L.A. Kelly & J.F. Muir, ed.). Blackwell, Oxford, EUA.
- WHO. 1998. World Health Organization. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Report of a WHO Meeting – Emerging and other communicable diseases, surveillance and control. Geneva, Sw June/1998. Disponível em: < http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO EMC_ZDI_98.10.pdf>. Acessada em: 25/07/2012.
- WOO P., BRUNO D. 2011. Fish: Diseases and Disorders, Viral, Bacterial and Fungal Infections. Segundo Edição, p. 456.
- YU H., TAO Y., CHEN D., PAN Y., LIU Z., WANG Y., HUANG L., DAI M., PENG D., WANG X., YUAN Z. 2012. Simultaneous determination of fluoroquinolones in foods of animal origin by a high performance liquid chromatography and a liquid chromatography tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction. *Journal of Chromatography B*, n. 885, p.150-159.

CAPÍTULO II

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE FLUOROQUINOLONAS EM TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) E PACU (*Piaractus mesopotamicus*) EMPREGANDO LC-MS/MS QToF

Este capítulo será submetido para publicação na Revista Food Additives and Contaminants

Determinação de resíduos de Fluoroquinolonas em tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) empregando LC-MS/MS QToF

RESUMO

O uso de antimicrobianos na produção animal é um poderoso recurso aplicado em todo o mundo para garantir altos rendimentos com o controle de bacterioses na aquicultura. No entanto, a presença de resíduos dessas substâncias em produtos de origem animal representa um risco potencial à saúde do consumidor, quando os níveis de resíduos estão acima dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos. As fluoroquinolonas (FQ) são antimicrobianos comumente utilizados na aquicultura mundial. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico para a determinação simultânea de norfloxacin, danofloxacin, enrofloxacin e ciprofloxacin em filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*), utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS QToF). As FQ foram extraídas dos filés utilizando soluções de 1% de ácido acético-metanol e 1% ácido acético-acetonitrila, com auxílio de ultrassom. A limpeza do extrato foi realizada utilizando-se hexano. Para a análise cromatográfica foi utilizada uma coluna XTerra RP18 (150 x 2,1 mm, 5 µm) a 25 °C, com vazão de 0,2 mL min⁻¹. A fase móvel foi composta por uma solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila, com eluição por gradiente. Para todas as FQ, os parâmetros de validação foram: linearidade (maior do que 0,99); precisão intra-dia (CV variou de 1 a 9%); precisão inter dias (CV variou de 3 a 17%); limite de decisão (variou de 104 a 110 ng g⁻¹); capacidade de detecção (variou de 118 a 119 ng g⁻¹); e exatidão (variou de 90 a 112%). Os limites de quantificação foram inferiores aos LMR estabelecidos para cada FQ (100 ng g⁻¹), indicando que o método é apropriado para a determinação de FQ em filés de peixe. O analisador de massas do tipo QToF foi capaz de confirmar as identidades das FQ, com erro de exatidão de massas (razões m/z) inferiores a 10 ppm.

Palavras-chave: fluoroquinolonas, antimicrobianos, tilápia, pacu, peixe, LC-MS/MS.

Determination of Residues of Fluoroquinolones in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) by LC-MS/MS QToF

SUMMARY

The use of antimicrobial in livestock production is a powerful resource applied throughout the world to guarantee high-yields, and control bacterial diseases in aquaculture. However, the residues of these substances in animal products represent a potential risk to the consumer's health when the residue levels are above the established maximum residue limits (MRL). Fluoroquinolones (FQ) are antimicrobials commonly used worldwide in aquaculture. The aim of this work was to develop and validate an analytical method for the simultaneous determination of norfloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in tilapia (*Oreochromis niloticus*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fillets, using liquid chromatography coupled to mass spectrometry *in tandem* (LC-MS/MS QToF). The FQ were extracted from the fillets with 1% acetic acid-methanol and 1% acetic acid-acetonitrile solutions, with ultrasonic assistance. Clean-up was performed using hexane. For the HPLC analysis was used a XTerra RP18 column (2.1 x 150 mm, 5 μ m) at 25 ° C with a flow of 0.2 ml min⁻¹. The mobile phase consisted of a 0.1% aqueous formic acid and acetonitrile, with gradient elution. The validation parameters for all FQ were: linearity (higher than 0.99), intra-day precision (CV between 1 - 9%), inter-day precision (CV between 3 - 17%), decision limit (between 104 - 110 ng g⁻¹), detection capability (between 118 - 119 ng g⁻¹) and accuracy (between 90 - 112%). The limit of quantitation was lower than the MRL of each FQ (100 ng g⁻¹), indicating that the method is suitable for the determination of FQ in fish fillets. The mass analyzer of the type QToF was able to confirm the identities of FQ with an error of the accuracy of mass (reasons m/z) below 10 ppm.

Keywords: fluoroquinolones, antimicrobials, tilapia, pacu, fish, LC-MS/MS

Introdução

No Brasil, a piscicultura é uma atividade que se encontra em crescimento e, em termos econômicos, vem se mostrando muito promissora. É considerada a forma mais econômica de se produzir alimentos de alto valor nutritivo (OLIVEIRA, 2009). Porém, como em toda a produção animal, inevitavelmente as doenças se manifestam, podendo resultar em perdas econômicas significativas. Todo sistema intensivo de produção animal constitui-se em um ambiente favorável à disseminação de doenças, devido à maior densidade populacional dos animais, com o agravante de que, na piscicultura, o ambiente aquático favorece a proliferação de patógenos. Eventuais alterações físico-químicas bruscas no ambiente aquático, como uma queda acentuada da temperatura, por exemplo, afetam diretamente a saúde dos peixes (PAVANELLI et al., 1998; ROTTA & QUEIROZ, 2003; ROBERTS, 1981). As doenças encontradas na piscicultura podem ser de origem parasitária, bacteriana, viral ou fúngica, sendo que as bacterioses destacam-se por serem apontadas como os principais fatores limitadores da produtividade e, entre as mais comuns, destacam-se a columnariose (ou podridão das brânquias), septicemia causada pelo grupo das *Aeromonas*, vibrioses, estreptococose (doença da natação espiralada), edwardsiellose e granuloma visceral. Essas doenças infecciosas podem ser causadas por diferentes bactérias patogênicas, como *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas sp.*, *Vibrio spp.*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Edwardsiella tarda*, *Francisella sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Piscirickettsia salmonis*, *Plesiomonas shigelloides* (RANZANI-PAIVA et al., 1997; ALBINATI, 2006).

Diante do exposto, em todo sistema de produção aquícola faz-se evidente a necessidade do uso de medicamentos veterinários, como os antimicrobianos que são utilizados no tratamento de doenças infecciosas (MCEWEN & FEDORKA-CRAY, 2002; GÓMEZ, 2011; MAZZUCHELLI & RODRÍGUEZ, 1997). Porém, no mundo existe uma grande preocupação relacionada ao uso indiscriminado de antimicrobianos na produção animal, principalmente no que concerne a questão da resistência microbiana, com potencial impacto tanto no sistema de produção animal como na saúde humana (WHO, 1998; OIE, 2003). No sistema de produção animal, a resistência microbiana pode potencializar o risco de perdas econômicas. Em relação à saúde humana, tem sido demonstrado, em diversos estudos, que o uso de antimicrobianos na aquicultura gera a aparição de bactérias resistentes, e há evidências epidemiológicas e moleculares, indicando que os genes que medeiam esta resistência podem ser transmitidos por bactérias aquáticas para bactérias capazes de produzir infecções em humanos e animais

terrestres (SENASICA, 2007; CABELLO, 2004; SORUM & L'ABEE-LUND, 2002; SORUM, 2009; SCHMIDT *et al.*, 2001; RHODES *et al.*, 2000).

Dentre os grupos de antimicrobianos mais utilizados mundialmente na piscicultura estão as penicilinas (amoxicilina), tetraciclina (oxitetraciclina), fluoroquinolonas, macrolídeos (eritromicina), sulfonamidas, entre outras (BARNES *et al.*, 1990 e 1991; INGLIS & RICHARDS, 1991; MARTISEN *et al.*, 1991; LIM & WEBSTER, 2001).

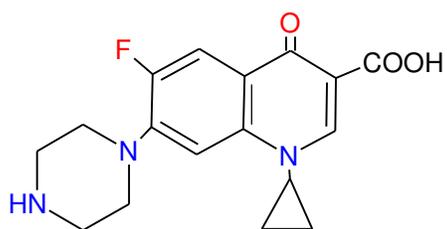
Destacam-se as fluoroquinolonas (FQ) por constituírem um grupo de antimicrobianos que possui um alto potencial para o tratamento de doenças causadas por bactérias G-positivas e G-negativas (TAVARES, 1996). Uma das características importantes deste grupo é ser considerado bactericida, já que possui CIM (Concentração Inibitória Mínima, isto é, concentração mínima do antibiótico que previne o crescimento bacteriano visível) e CBM (Concentração Bactericida Mínima, isto é, concentração mínima do antibiótico que mata 99,9% do número original de bactérias) com magnitudes semelhantes. Produzem um prolongado efeito pós-antibiótico, e também apresentam uma liberação lenta a partir do tecido, assegurando o prolongamento do intervalo entre as doses, permitindo assim a administração de uma dose única diária (BUFFÉ *et al.*, 2001). Dentre as FQ mais utilizadas na piscicultura mundial destacam-se a flumequina, a sarafloxacin e a enrofloxacin (WOO & BRUNO, 2011; MELLA *et al.*, 2000).

Na América Latina, o Brasil destaca-se como o maior produtor de medicamentos veterinários e o segundo maior produtor aquícola. No entanto, atualmente existem somente três medicamentos veterinários disponíveis para uso na aquicultura, os quais foram recentemente regulamentados, que são o florfenicol, a oxitetraciclina e um antiparasitário à base de triclorfon. Devido à carência de alternativas de medicamentos veterinários prescritos para uso na aquicultura e ao alto custo dos medicamentos disponíveis, há suspeita de que piscicultores estejam recorrendo ao uso irregular de medicamentos veterinários prescritos para outras espécies animais, e até mesmo o uso de substâncias ilícitas, como o corante verde de malaquita (HASHIMOTO, *et al.*, 2011; MPA, 2012; BRITSKI *et al.*, 1999; IEL/NC-SEBRAE, 2006; FAO, 2010).

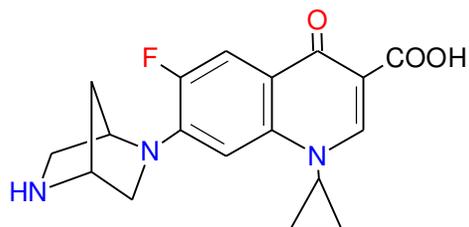
Entre as espécies mais cultivadas na piscicultura brasileira destacam-se a tilápia (*Oreochromis spp.*), que é também a segunda espécie mais cultivada no mundo, e o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), que por se tratar de uma espécie nativa, possui boa produtividade, adaptabilidade e aceitação por parte do consumidor, já que possui carne firme e bom sabor (FAO, 2010).

Com relação às técnicas analíticas empregadas na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, a União Europeia, através da Diretiva 96/23/EC, descrita pela Comissão de Decisão 2002/657/EC, destaca a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) como sendo aquela capaz de oferecer altas seletividade e detectabilidade ao método analítico. Espectrômetros de massas compostos por analisadores de massas do tipo tempo de voo (“*time of flight*”, ToF) têm sido utilizados em métodos de avaliação de rotina para o controle da salubridade dos alimentos, promovendo uma alta precisão, medida de massa exata e alta sensibilidade no modo de varredura total, resultando num excelente método analítico para a quantificação e confirmação de identidade de contaminantes em alimentos (JUAN-GARCÍA et al, 2006; SONGSERMSAKUL & RAZZAZI-FAZELI, 2008).

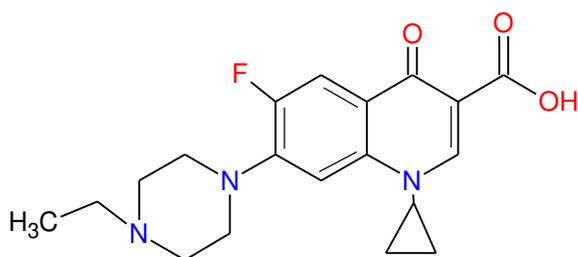
O objetivo deste trabalho foi o de se estabelecer um método analítico para a determinação de resíduos de FQ em filés de peixes (tilápia e pacu), otimizando o processo de extração, e empregando LC-MS/MS como técnica analítica, utilizando um equipamento de MS composto de um sistema híbrido de analisadores de massas do tipo quadrupolo e tempo de voo (QToF). O método analítico foi validado a partir de um protocolo intra-laboratorial estabelecido, tomando-se como bases as recomendações dos principais guias nacionais e internacionais de validação (MAPA, 2011; EC, 2002; IUPAC, 2002). A seleção dos fármacos representantes do grupo das FQ a comporem o foco analítico no presente estudo (Fig. 1) foi realizada a partir de um levantamento no Compêndio de Produtos Veterinários (CPVS) do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos Para a Saúde Animal (SINDAN), no qual se buscou selecionar aqueles que se encontram disponíveis no Brasil, prescritos para outras espécies animais, e que potencialmente poderiam estar sendo empregados de forma irregular na piscicultura. A partir do método analítico estabelecido e validado, foram realizadas análises de amostras de peixes de ambas as espécies estudadas, disponíveis aos consumidores no Estado de São Paulo, Brasil.



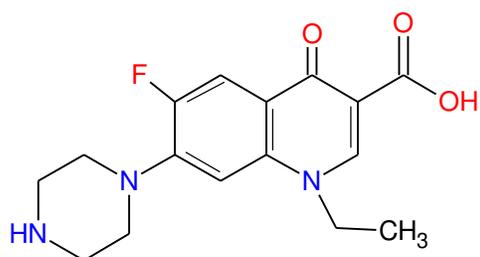
Ciprofloxacin (CIP)



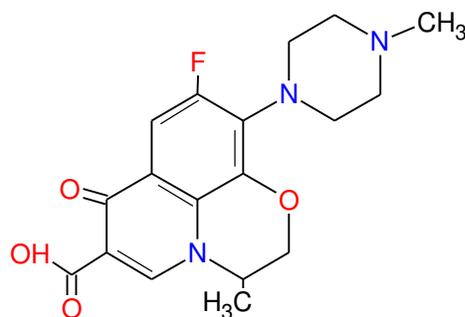
Danofloxacin (DAN)



Enrofloxacin (ENR)



Norfloxacin (NOR)



Ofloxacin (OFL)

Figura 1. Estrutura molecular das fluoroquinolonas estudadas.

Materiais e Métodos

Solventes e reagentes

Os padrões analíticos utilizados neste trabalho foram: enrofloxacin (ENR) e danofloxacin (DAN) (98%, Fluka analytical – Sigma Aldrich, Alemanha). Ciprofloxacin (CIP), norfloxacin (NOR) e o padrão interno, ofloxacin (OFL) (98%, Fluka analytical –

Sigma Aldrich, China). Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC e os reagentes de grau analítico. A acetonitrila (ACN) foi obtida da J.T. Baker (Philipsburg, EUA), o metanol (MeOH) foi comprado do Honeywell Burdick & Jackson (Muskegon, EUA). O ácido fórmico, grau analítico, foi adquirido da Acros Organics (New Jersey, EUA). O hexano foi comprado do Carlo Erba (Rodano, Italy). O ácido acético glacial foi obtido do Qhemis (Brasil). Durante este estudo, utilizou-se água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). As fases móveis foram filtradas utilizando membranas com uma porosidade de 0,22 μm de fluoreto de polivinilideno (PVDF) e politetrafluoretileno (PTFE) (Millipore, EUA). As soluções das amostras e padrões foram filtradas utilizando filtros de PVDF de 0,22 μm (Millipore, EUA).

Equipamentos

O equipamento utilizado (LC-MS/MS) consistiu de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (modelo Alliance 2695, Waters, EUA), composto por um sistema de bombeamento quaternário, sistema de injeção automática, associado por interface do tipo ionização por eletronebulização, a um espectrômetro de massas (modelo Q-ToF micro, Micromass, Waters, EUA) híbrido composto por dois analisadores de massas em série: quadrupolo (Q) e tempo de voo (“time of flight”, ToF). A aquisição de dados foi realizada mediante o programa computacional MassLynx 4.0 (Waters, EUA).

Para a desgaseificação da fase móvel e para o preparo de amostras foi empregado um banho de ultrassom (modelo 08895-10, Cole Parmer, México). No preparo de soluções utilizou-se água deionizada purificada em sistema Milli-Q, modelo Academic (Millipore, EUA). E para o preparo das amostras utilizou-se uma balança analítica (modelo BL 2105, Sartorius, Alemanha), um processador doméstico (modelo RI 2044, Philips, Brasil), um agitador de tubos tipo vortex (modelo AP 56, Phoenix, Brasil), uma centrífuga (modelo CR 21, HITACHI, Japão) e um evaporador rotativo (modelo MA 120, Marconi, Brasil).

Preparo das soluções padrões

As soluções estoques ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) de ENR, CIP, DAN, NOR e OFL (padrão interno) foram preparadas dissolvendo-se 50 mg de cada analito em 1 mL ácido acético glacial, e completando os volumes para 50 mL com MeOH. Foram armazenadas em frasco âmbar e mantidas em freezer ($-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$). As soluções intermediárias com uma concentração de $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas diariamente para cada analito, utilizando o

padrão interno (OFL), diluindo as soluções estoques em ácido fórmico 0,1% v/v. As soluções de trabalho foram preparadas imediatamente antes da utilização, em concentrações apropriadas para obterem as curvas analíticas para cada analito.

Branco das matrizes tilápia e pacu

As amostras branco de tilápia e pacu utilizadas para o estabelecimento das condições analíticas iniciais, bem como no procedimento de validação do método analítico, foram de procedência conhecida, com a garantia da isenção da presença das substâncias selecionadas para o foco analítico do presente trabalho, cedidas pelo Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP, SP, Brasil). Ainda, com o objetivo de se garantir a viabilidade do uso dessas amostras como amostras branco, as mesmas foram analisadas e os cromatogramas inspecionados quanto à presença de interferentes que poderiam comprometer o desenvolvimento do método analítico. Nenhum interferente foi detectado nos tempos de retenção correspondentes aos analitos estudados.

Para o procedimento de validação do método analítico estabelecido no presente estudo, além de amostras branco, foram também utilizadas amostras incorridas, isto é, amostras de peixes que foram contaminados com enrofloxacin através da ração, procedentes de um ensaio realizado na ESALQ/USP. Neste ensaio, peixes da espécie pacu foram medicados, através da ração, com ENR na dose de 10 mg/kg peso vivo, durante 10 dias consecutivos, sendo abatidos por choque térmico através de imersão em banho de gelo (0 a 2 °C). As amostras incorridas utilizadas no presente estudo são de peixes abatidos após 12 horas da interrupção do tratamento com a medicação. Todas as amostras foram armazenadas em freezer (-18 °C) até a análise, por um período de, no máximo, cinco dias.

Procedimento de Extração

O procedimento de extração foi otimizado mediante a avaliação da eficiência de extração para cada um dos analitos. A eficiência de extração consiste na análise de amostras branco, previamente fortificadas com os analitos (inclusive o padrão interno) em concentrações conhecidas, submetidas ao processo de extração. A concentração dos analitos na amostra branco após o procedimento de extração é calculada a partir do uso de uma curva analítica externa (analitos em solvente). Os resultados são calculados e

expressos em porcentagem, isto é, a concentração obtida vezes 100, dividida pela concentração esperada (utilizada na fortificação).

Inicialmente, as amostras (filés de tilápia ou pacu) foram individualmente trituradas e homogeneizadas utilizando-se um processador doméstico de alimentos. Uma alíquota de 1,0 g de amostra foi coletada e transferida para tubos do tipo falcon de polipropileno de 30 mL. Nas amostras utilizadas no processo de validação analítica, foram adicionados 200 µL de uma solução padrão contendo todas as FQ, em concentrações correspondentes aos níveis de fortificação empregados (0, 25, 50, 100, 150 e 200 ng g⁻¹), incluindo o padrão interno (OFL) numa concentração correspondente a 100 ng g⁻¹.

Às amostras desconhecidas foram adicionados 200 µL de uma solução contendo apenas o padrão interno, na concentração correspondente a 100 ng g⁻¹. As amostras foram vigorosamente agitadas durante 30 s. Em seguida, foram adicionados 15 mL de solução extratora A (1% de ácido acético e MeOH, v/v;) e os tubos foram agitados por 1 min. Depois foi adicionado 150 mg de PSA, com o intuito de se melhorar a precipitação da fração proteica, e novamente foram agitados por 30 s. Os tubos foram então ultrassonificados por 10 min, e centrifugados à 12.300 g por 15 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo do tipo falcon de polipropileno (50 mL). O precipitado foi ressuspenso em 15 mL de solução extratora B (1% ácido acético e ACN, v/v), agitado, ultrassonificado e centrifugado seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Os sobrenadantes foram agrupados e receberam 5 mL de hexano para a limpeza do extrato, seguidos de agitação por 30 s e centrifugação a 1100 g por 30 s. A fração superior, contendo o hexano, foi removida por sucção a vácuo. O extrato foi evaporado até a secura completa, utilizando um evaporador rotatório à temperatura de 47 °C. Procedeu-se, então, a ressuspenção do resíduo em 1,0 mL de solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% e filtração em membrana de porosidade de 0,22 µm. O esquema do procedimento de extração é ilustrado na Fig.2.

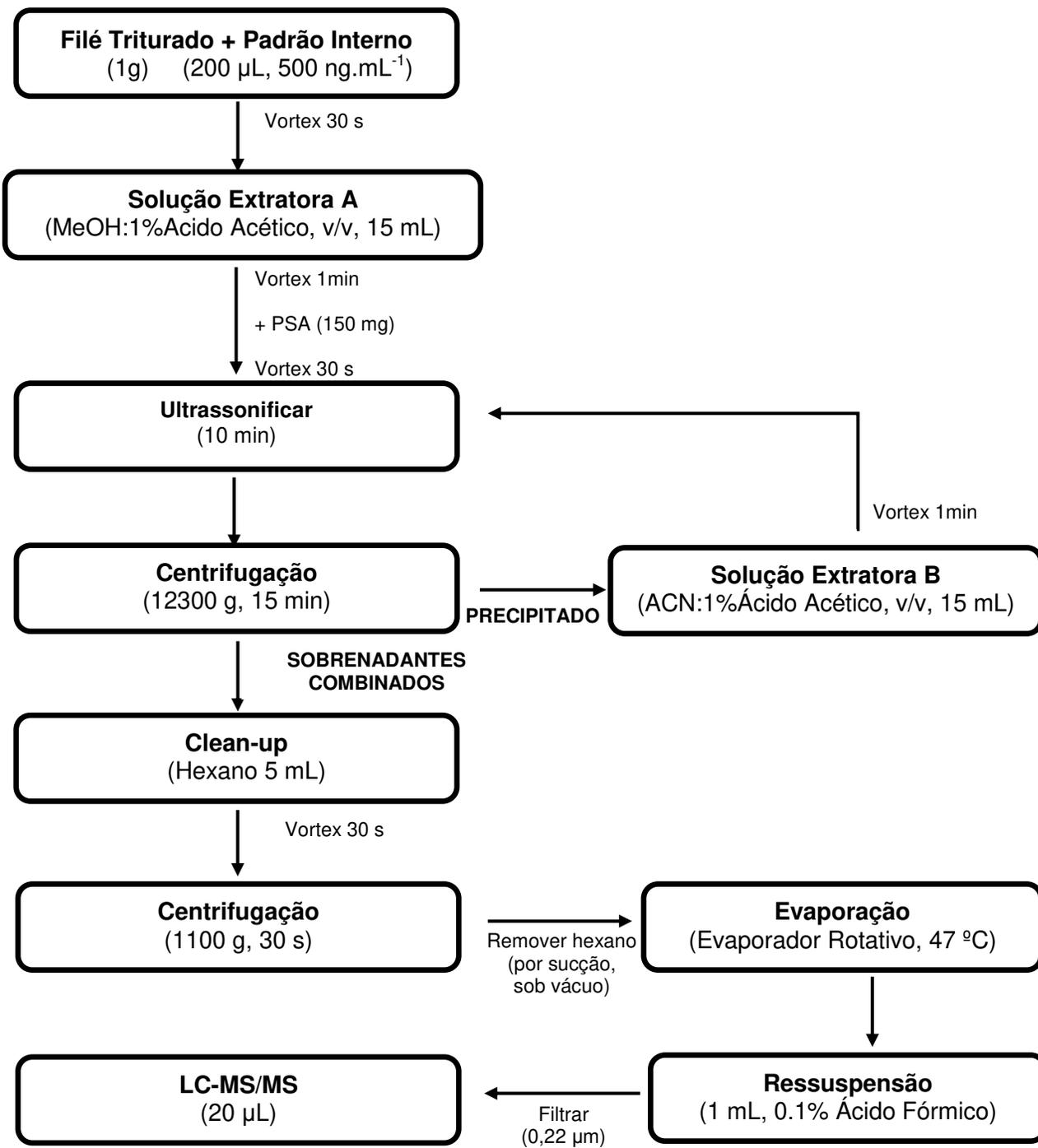


Figura 2. Esquema do procedimento de extração do método analítico desenvolvido

Condições cromatográficas (LC-MS/MS)

A coluna cromatográfica empregada foi uma C₁₈ de fase híbrida, de dimensões 150 x 2,1 mm, 5 µm (XTerra, Waters, EUA). A temperatura de operação da coluna foi de 25 °C. A fase móvel foi composta por uma solução aquosa de 0,1% ácido fórmico (fase aquosa, FA) e acetonitrila (fase orgânica, FO), com eluição por gradiente (90 % FA e 10 % de FO de 0 a 2 min.; mudando para 10 % de FA e 90% de FO de 2 a 7,2 min.; e voltando à proporção inicial no minuto seguinte mantendo essa proporção até 13 min). Também foi feita uma variação na vazão da fase móvel (de 0 min. a 2 min. sob vazão 0,2 mL min⁻¹; aumentando para 0,3 mL min⁻¹ a partir do minuto seguinte até 7,2 min.; se incrementando para 0,4 mL min⁻¹ até 10,5 min.; e voltando para a vazão inicial até o 13 min). O volume de injeção foi de 20 µL.

Para o método quantitativo, foram estabelecidas as seguintes condições de ionização: vazão do gás no cone (150 L h⁻¹); vazão do gás de dessolvatação (500 L h⁻¹); ionização positiva (ES+); voltagem no capilar (3000 V); voltagem no cone de amostragem (30 V); voltagem no cone de extração (2,5 V); temperatura de dessolvatação (250 °C); temperatura na fonte (150 °C); energia de ionização (2 V); energia de colisão (5 V); voltagem no detector do tipo placa de multi-canal (2780 V). Para a confirmação da identidade dos analitos, as condições de ionização foram as mesmas mencionadas aqui, com a diferença de que a energia de colisão passou de 5 V para 20 V.

Para a quantificação das fluoroquinolonas, com o intuito de melhorar a razão sinal/ruído, o analisador quadrupolo foi utilizado para filtrar os íons. Deste modo, o analisador quadrupolo foi programado para selecionar íons por m/z num intervalo em torno aos íons das fluoroquinolonas estudadas (300 a 400 u).

Para a análise de confirmação de identidade, os íons moleculares e os íons fragmentos foram considerados.

Validação do método analítico

Depois de estabelecidas as condições analíticas para a determinação de ENR, DAN, CIP e NOR conforme descrito, procedeu-se a validação intra-laboratorial do método analítico, tomando-se como referência as recomendações da Comunidade Europeia (EC, 2002) e do Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos em Produtos para a Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários (MAPA, 2011), utilizando padronização interna com OFL.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade e sensibilidade, seletividade, precisão intra-dia (com amostras fortificadas e amostras incorridas) e inter-dias, efeito matriz, exatidão, limite de decisão, capacidade de detecção, limite de detecção e limite de quantificação.

Para realizar a validação, os seguintes níveis de concentração da curva analítica: 0,0 – 0,25 – 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 vezes o LMR (100 ng g^{-1}) foram estabelecidos para cada um dos analitos, sendo que o padrão interno (OFL) foi mantido sempre na mesma concentração (100 ng g^{-1}) em cada nível das curvas analíticas. Foram preparadas três tipos de curvas analíticas: com os analitos dissolvidos em solvente, no extrato fortificado e na matriz fortificada. Para a obtenção da curva analítica no solvente, os analitos foram dissolvidos na solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%. Para a curva no extrato, amostras branco foram submetidas ao processo de extração, e fortificadas, durante a etapa de ressuspensão do extrato. Para a curva na matriz, amostras branco foram fortificadas antes de se realizar o processo de extração. Dessa forma, os níveis de concentração dos analitos foram de 0,0 – 25 – 50 – 100 – 150 – 200 ng mL^{-1} para a curva analítica no solvente e em ng g^{-1} para as demais.

A linearidade (r) e sensibilidade (s) de cada uma das FQ foram expressas, respectivamente, através dos coeficientes lineares (r) e angulares obtidos a partir das respectivas curvas analíticas na matriz fortificada, replicadas três vezes por dia e em três dias diferentes.

A seletividade do método foi avaliada utilizando-se as amostras branco de peixe, verificando nos cromatogramas a presença de potenciais interferentes coeluídos próximos ao tempo de retenção de cada analito.

O efeito matriz é um estudo complementar de seletividade que objetiva verificar possíveis interferências causadas por elementos diversos que compõem a matriz amostral gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal de emissão. Foi avaliado a partir da comparação dos resultados obtidos para o extrato fortificado nos níveis de concentração correspondentes a 50;100; 150 ng g^{-1} (ou ng mL^{-1}), com os resultados obtidos para os mesmos níveis de concentração dos analitos dissolvidos em solvente. Os efeitos obtidos para cada um dos analitos foram expressos em porcentagem, a partir da diferença entre os sinais obtidos para o extrato fortificado e o mesmo nível de concentração do analito em solução, dividido pelo sinal do analito em solução.

A exatidão do método foi avaliada mediante o ensaio de recuperação (%), utilizando amostras fortificadas na matriz em níveis de concentração correspondentes a 50 – 100 – 150 ng g⁻¹ para cada FQ. Os resultados foram expressos como a porcentagem da concentração esperada (concentração utilizada na fortificação) do analito.

A precisão do método desenvolvido foi avaliada em duas fases: a precisão intra-dia (com amostras fortificadas e amostras incorridas) e a precisão inter-dias (com amostras fortificadas). A precisão intra-dia foi obtida a partir da avaliação da variação (Coeficiente de Variação, CV, %) dos resultados obtidos em triplicatas (n=3), com o método desenvolvido, em um mesmo dia, com o mesmo equipamento, o mesmo operador, utilizando-se amostras branco fortificadas com as FQ em três níveis diferentes de concentração (50 – 100 – 150 ng g⁻¹). Este procedimento foi repetido por mais dois dias, sendo que a média dos CV de cada um dos dias foi utilizado para expressar a precisão intra-dias com amostras fortificadas. Para os analitos ENR e CIP foi possível avaliar a precisão intra-dias com amostras incorridas, isto é, amostras de peixes que receberam ENR através da ração e que, por isso, são consideradas amostras genuinamente contaminadas com os analitos ENR e CIP, já que a CIP é o principal metabólito da ENR. Para tanto, foram utilizadas três amostras, com diferentes níveis de concentração para ambas FQ, analisadas em triplicata em um mesmo dia, nas mesmas condições analíticas estabelecidas, com o mesmo equipamento e o mesmo operador.

A precisão inter-dias foi obtida de forma semelhante à descrita para a precisão intra-dia com amostras fortificadas, com as FQ nas mesmas concentrações, com a diferença de que o CV foi obtido a partir da comparação dos resultados obtidos em três dias diferentes (n=3). Para tanto, foram calculadas as médias dos resultados obtidos das triplicatas de cada uma das concentrações fortificadas e analisadas em cada um dos três dias, e expressou-se a precisão inter-dias através do CV das mesmas.

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para cada uma das FQ foram determinados a partir da razão sinal/ruído igual a 3 e 10, respectivamente, nos tempos de retenção das mesmas, em amostras branco (n=3), e os resultados são apresentados como valores médios das repetições.

O Limite de Decisão (CC_α) foi calculado somando-se a concentração no LMR com 1,64 vezes o desvio padrão da precisão intra-laboratorial, enquanto a Capacidade de Detecção (CC_β) consistiu da soma de CC_α com 1,64 vezes o desvio padrão da precisão intra-laboratorial. No presente estudo, representou-se a precisão intra-laboratorial através da precisão inter-dias.

Para o caso de métodos analíticos que visem a determinação de analitos para os quais há LMR estabelecidos, como é o caso do presente estudo, as probabilidades de erro α e β são de 5% e, por isso, seguindo as recomendações dos guias de validação, CC α Todos os parâmetros de validação foram avaliados tomando-se o filé de pacu como matriz. Seguindo as recomendações dos guias de validação tomados como referência no presente estudo (MAPA 2011; EC, 2002), procedeu-se a avaliação da inclusão da matriz filé de tilápia a ser analisada pelo mesmo método analítico estabelecido para filé de pacu. Para tanto, utilizando-se filé de tilápia, procedeu-se a obtenção das curvas analíticas na matriz fortificada e no extrato fortificado, nas mesmas concentrações e da mesma forma descritas para filé de pacu. Foram avaliados os parâmetros linearidade, seletividade/efeito matriz, recuperação e exatidão, tomando-se a premissa de que, em caso de similaridade dos resultados obtidos para esses parâmetros em ambas as matrizes, os demais parâmetros de validação seriam dispensados de serem avaliados.

Resultados e Discussão

Preparo da amostra

As amostras biológicas são reconhecidamente de composição complexa. De forma geral, a extração de analitos com características lipofílicas são dificultadas em matrizes que contenham maiores teores de lipídeos. As FQ são compostos anfóteros, e podem ter sua extração dificultada devido a presença de lipídeos na matriz biológica. Levando esse aspecto em consideração, e observando que a proposta do presente projeto é o de se realizar a determinação de FQ em filés de duas espécies diferentes de peixes, optou-se por utilizar como matriz base para o estabelecimento e otimização das etapas envolvidas no processo de extração o filé de pacu, por se tratar de uma matriz cuja composição de lipídios é de cerca de quatro vezes maior que a de tilápia (MENDES, 2007). Dessa forma, o potencial de aplicabilidade do mesmo método estabelecido e otimizado para a extração de FQ em filé de pacu, para a extração em filé de tilápia, seja mais promissor do que o contrário.

Os estudos iniciais para o estabelecimento e otimização das etapas envolvidas no processo de extração dos analitos CIP, ENR, DAN e NOR foram realizados tomando como referência as condições descritas em PASCHOAL *et al.* (2009^{a,b}). O procedimento foi baseado na extração sólido-líquido com o uso de solução extratora, seguido de

limpeza do extrato com hexano. Para tanto, foram testadas diferentes composições da solução extratora, variando o solvente orgânico (MeOH e ACN), acidificados com ácido acético 1% (v/v).

Nos estudos da composição da solução extratora, verificou-se que o emprego de duas soluções diferentes, utilizadas sequencialmente, proporcionou os melhores resultados de eficiências de extração dos analitos. As soluções empregadas foram: solução A (1% ácido acético: MeOH, v/v, 15 mL) e solução B (1% ácido acético: ACN, v/v, 15 mL). Cabe mencionar de que a ACN e o MeOH, como solventes extratores, são amplamente utilizados em estudos de determinação de resíduos de quinolonas e fluoroquinolonas (STOLKER & BRINKMAN, 2005; KINSELLA *et al.*, 2009; STUBBINGS & BIGWOOD, 2009, PEREIRA, 2012).

Também foi verificado que, depois da utilização da solução extratora A, a adição de PSA (150 mg) como sorvente, o qual apresenta um elevado efeito quelante pela presença dos grupos amino primário e secundário, contribuiu para a retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz (HERNANDO *et al.*, 2006; PRESTES *et al.*, 2009; HASHIMOTO *et al.*, 2012), e melhorou a eficiência de extração dos analitos.

A etapa da limpeza do extrato foi inserida com a finalidade de se promover a remoção de interferentes lipídicos, e para tanto, foram adicionados 5 mL de hexano aos sobrenadantes combinados, considerando que os lipídeos são compostos solúveis e que FQ são insolúveis em solvente apolares (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

O emprego das duas soluções de extração, do PSA e da etapa de limpeza do extrato com hexano, proporcionaram uma eficiência de extração média de 94% para os analitos. A comprovação da versatilidade do método para ser aplicado em ambas as matrizes (filé de pacu e de tilápia) será melhor discutida durante a apresentação dos resultados de validação analítica do método.

Confirmação de Identidade por LC-MS/MS

O guia do MAPA (2011) e da Comunidade Europeia (EC, 2002), definem que os métodos confirmatórios para resíduos orgânicos em alimentos devem fornecer indicações completas sobre a estrutura química dos analitos, sendo a técnica de espectrometria de massas reconhecidamente capaz de suprir tal exigência.

No entanto, há critérios a serem cumpridos para a confirmação de identidade dos analitos diferentes para espectrômetros de massas de alta e de baixa resolução,

baseados no sistema conhecido como Pontos de Identificação (IP), que estão relacionados com a quantidade de íons fragmentos necessários para se garantir a identidade de um determinado analito. Para analisadores de massas de baixa resolução (abaixo de 10.000), tais como o triploquadruplo (QqQ), 3 IP são necessários para a confirmação da identidade de substâncias para as quais há LMR estabelecidos, como é o caso das FQ. Embora o equipamento utilizado no presente estudo (QToF Micro®) permita exatidão de massas (m/z) com erros inferiores a 10 ppm, sua resolução é inferior a 10.000, o que não o enquadra dentro dos critérios estabelecidos pelos referidos guias como sendo um MS de alta resolução. Portanto, pelo menos 3 íons devem ser monitorados no modo sequencial (MS/MS) a fim de se atingir os 3 IP requeridos.

Nas condições selecionadas, foi possível monitorar o íon da molécula protonada e dois íons fragmentos para cada analito, atingindo os requisitos para confirmação de suas identidades de acordo com os guias de validação tomados como referência no presente estudo. A Tabela 1 apresenta os íons monitorados para a propósito da confirmação de identidade dos analitos estudados. Vale destacar que, para as análises quantitativas, apenas os íons moleculares das FQ foram monitorados.

Validação analítica

Os parâmetros avaliados para garantir a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos foram: seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão intra-dia (amostras fortificadas e amostras incorridas), precisão inter-dias (amostras fortificadas), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), efeito matriz, exatidão, limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$). Os resultados dos parâmetros avaliados estão sumarizados nas Tabelas 2 e 3.

Avaliou-se a seletividade comparando os cromatogramas obtidos das amostras branco e amostras branco fortificadas, para a verificação da presença de potenciais interferentes em tempos de retenção próximos aos dos analitos. Conforme pode ser verificado nas Figuras 3 e 4, o método se apresentou satisfatoriamente seletivo.

Com o propósito de se avaliar o efeito matriz, que também contribui para a apreciação da seletividade do método, foram obtidas curvas analíticas a partir da matriz fortificada, do extrato fortificado e dos analitos dissolvidos em solvente. Segundo as recomendações do guia de validação do MAPA (2011), as curvas devem conter pelo menos cinco níveis de fortificação (0,0 - 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 vezes o LMR). No presente

estudo, além dos níveis de fortificação recomendados pelos guias de validação, foi inserido mais um nível, correspondente a 0,25 vezes o LMR. Como para todas as FQ aqui estudadas há um mesmo LMR adotado igual a 100 ng g⁻¹, as curvas analíticas para cada um dos analitos foi composta por seis níveis de concentração: 0,0 – 25 – 50 – 100 – 150 – 200, ng g⁻¹.

Tabela 1. Composição elementar e medida de massa exata para íons obtidos em soluções padrão utilizando o sistema ToF-MS.

FQ	Fórmula Molecular	Íons Molecular (m/z) [M+H] ⁺	Íons produtos			
			Composição Elementar	Massa Teórica	Massa Experimental	Erro (ppm)
CIP	C ₁₇ H ₁₈ O ₃ N ₃ F ₁	332,1410 ^a	C ₁₇ H ₁₇ O ₂ N ₃ F ₁	314,1305	314,1310	- 1,59
		332,1404 ^b (+ 1,81) ^c	C ₁₆ H ₁₉ O ₁ N ₃ F ₁	288,1512	288,1519	- 2,43
ENR	C ₁₉ H ₂₂ O ₃ N ₃ F ₁	360,1723	C ₁₉ H ₂₁ O ₂ N ₃ F ₁	342,1618	342,1619	- 0,29
		360,1724 (- 0,28)	C ₁₈ H ₂₃ O ₁ N ₃ F ₁	316,1825	316,1833	- 2,53
DAN	C ₁₉ H ₂₀ O ₃ N ₃ F ₁	358,1567	C ₁₉ H ₁₉ O ₂ N ₃ F ₁	340,1461	340,1467	- 1,76
		358,1566 (+ 0,28)	C ₁₈ H ₂₀ O ₁ N ₃ F ₁	314,1668	314,1670	- 0,64
NOR	C ₁₆ H ₁₈ O ₃ N ₃ F ₁	320,1410	C ₁₆ H ₁₇ O ₂ N ₃ F ₁	302,1350	302,1323	- 5,96
		320,1425 (- 4,69)	C ₁₅ H ₁₈ O ₁ N ₃ F ₁	276,1512	276,1544	-11,59
OFL (PI)	C ₁₈ H ₂₀ O ₄ N ₃ F ₁	362,1516	C ₁₈ H ₁₈ O ₃ N ₃ F ₁	344,1410	344,1430	- 5,81
		362,1544 (- 7,73)	C ₁₇ H ₂₀ O ₂ N ₃ F ₁	318,1618	318,1632	- 4,40

^a Massa teórica, ^b Massa experimental, ^c Δ ppm, PI : padrão interno

O efeito matriz foi avaliado comparando-se os resultados analíticos dos níveis de concentração correspondente a 50 – 100 – 150 ng g⁻¹, obtidos para o extrato fortificado e o analito no solvente. Os resultados são apresentados nas Tabelas 2 e 3, onde pode se observar um efeito matriz máximo de 13%, o qual é inferior ao valor máximo aceito para a repetibilidade do método (< 20%) nos níveis de concentração estudados, indicando que a matriz (pacu e tilápia) apresenta uma interferência mínima na ionização dos analitos.

Tabela 2 Parâmetros de validação para matriz filé de pacu.

Parâmetros de Validação	FLUOROQUINOLONAS			
	NOR	DAN	ENR	CIP
Faixa de trabalho (ng g^{-1})	25-200	25-200	25-200	25-200
Linearidade (r)	0,9957	0,9970	0,9962	0,9986
Sensibilidade ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,00195	0,00183	0,00118	0,00315
Precisão Intra-Dia (CV%)				
50 ng g^{-1}	8	9	3	7
100 ng g^{-1}	2	4	3	2
150 ng g^{-1}	4	3	1	3
Precisão Inter-Dia (CV%)				
50 ng g^{-1}	8	12	3	17
100 ng g^{-1}	4	16	8	15
150 ng g^{-1}	5	15	3	11
Precisão Amostras Incorrida (CV%)				
2120 ng g^{-1}	-	-	3	-
2302 ng g^{-1}	-	-	9	-
1436 ng g^{-1}	-	-	2	-
163 ng g^{-1}	-	-	-	2
149 ng g^{-1}	-	-	-	3
90 ng g^{-1}	-	-	-	1
LOD (ng g^{-1})	7	6	7	8
LOQ (ng g^{-1})	25	25	25	25
Efeito Matriz (%)				
50 ng g^{-1}	9	4	10	3
100 ng g^{-1}	8	2	7	2
150 ng g^{-1}	11	-1	-1	3
CCα (ng g^{-1})	104	109	104	110
CCβ (ng g^{-1})	108	119	108	119
Exatidão (% Recuperação)				
50 ng g^{-1}	92-103	92-105	97-108	93-108
100 ng g^{-1}	99-111	99-104	101-108	93-110
150 ng g^{-1}	92-110	90-106	97-105	91-112

Tabela 3. Parâmetros de validação para matriz filé de tilápia.

Parâmetros de Validação	FLUOROQUINOLONAS			
	NOR	DAN	ENR	CIP
Faixa de trabalho (ng g⁻¹)	25-200	25-200	25-200	25-200
Linearidade (r)	0,9975	0,9969	0,9993	0,9984
LOD (ng g⁻¹)	7	7	7	8
LOQ (ng g⁻¹)	25	25	25	25
Efeito Matriz (%)				
50 ng g ⁻¹	4	-5	13	-5
100 ng g ⁻¹	7	7	10	2
150 ng g ⁻¹	11	2	9	2
Exatidão (% Recuperação)				
50 ng g ⁻¹	94-99	97-100	95-102	95-106
100 ng g ⁻¹	96-107	98-103	93-101	92-99
150 ng g ⁻¹	95-105	94-104	100-103	92-103

A linearidade e a sensibilidade do método foram obtidas a partir das curvas analíticas matrizadas (com a matriz fortificada), e são representadas, respectivamente, pelo coeficiente linear (r) e pelo coeficiente angular das curvas de cada uma das FQ. Conforme apresentado nas Tabelas 2 e 3, a linearidade para todos os analitos em ambas matrizes foi superior a 0,99, o que atende as recomendações dos guias de validação adotados no presente estudo.

Na determinação da sensibilidade do método, medida através do coeficiente angular da curva analítica matrizada, os valores obtidos foram de: 0,00195; 0,00183; 0,00118 e 0,00315 ua ng g⁻¹ para NOR, DAN, ENR e CIP respectivamente. Os valores obtidos para três (CIP, DAN e ENR) dos quatro analitos estudados, são próximos aos apresentados por PASCHOAL *et al.* (2009) utilizando a mesma técnica analítica de sistema de detecção (MS/MS QToF) em filé de tilápia.

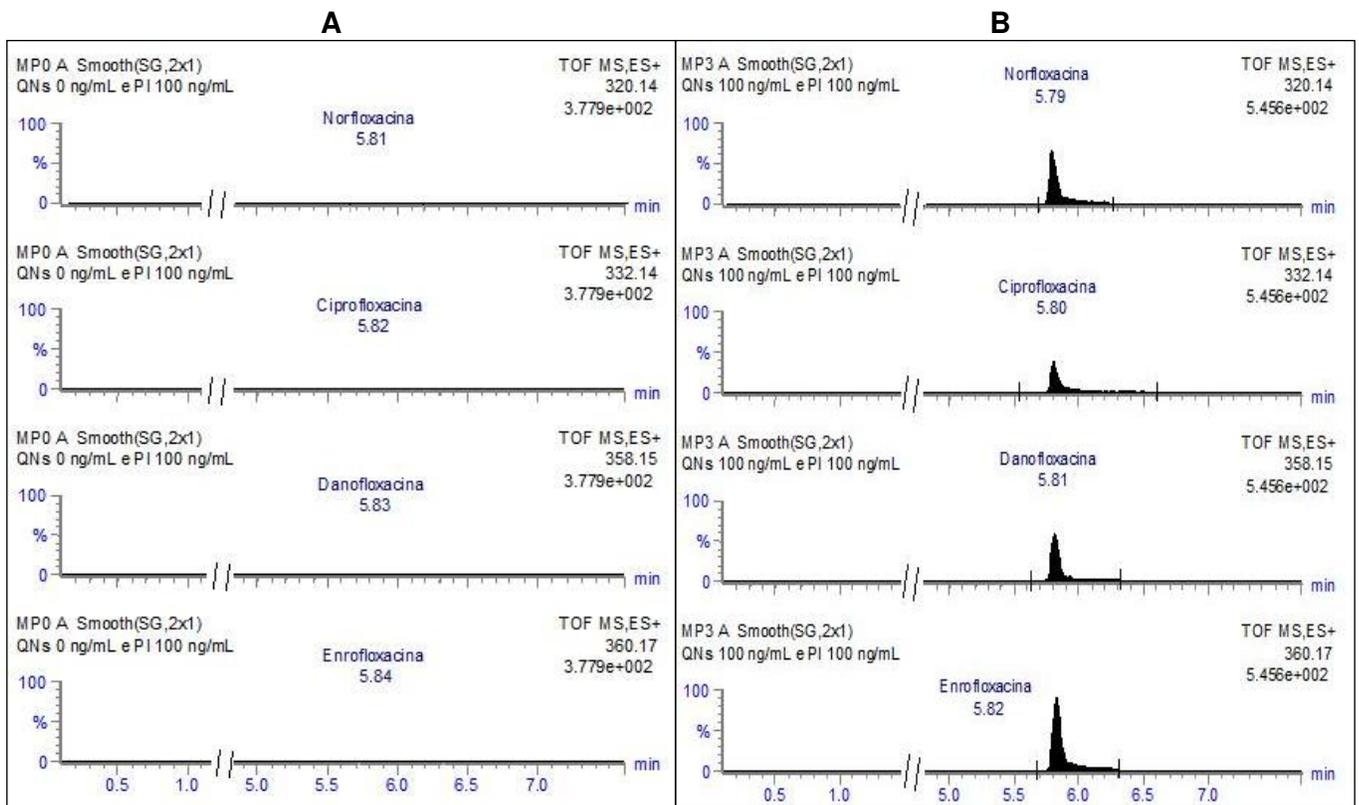


Figura 3. Comparação de cromatogramas de amostras branco (A) e fortificadas (B) (100 ng g⁻¹) de filé de pacu.

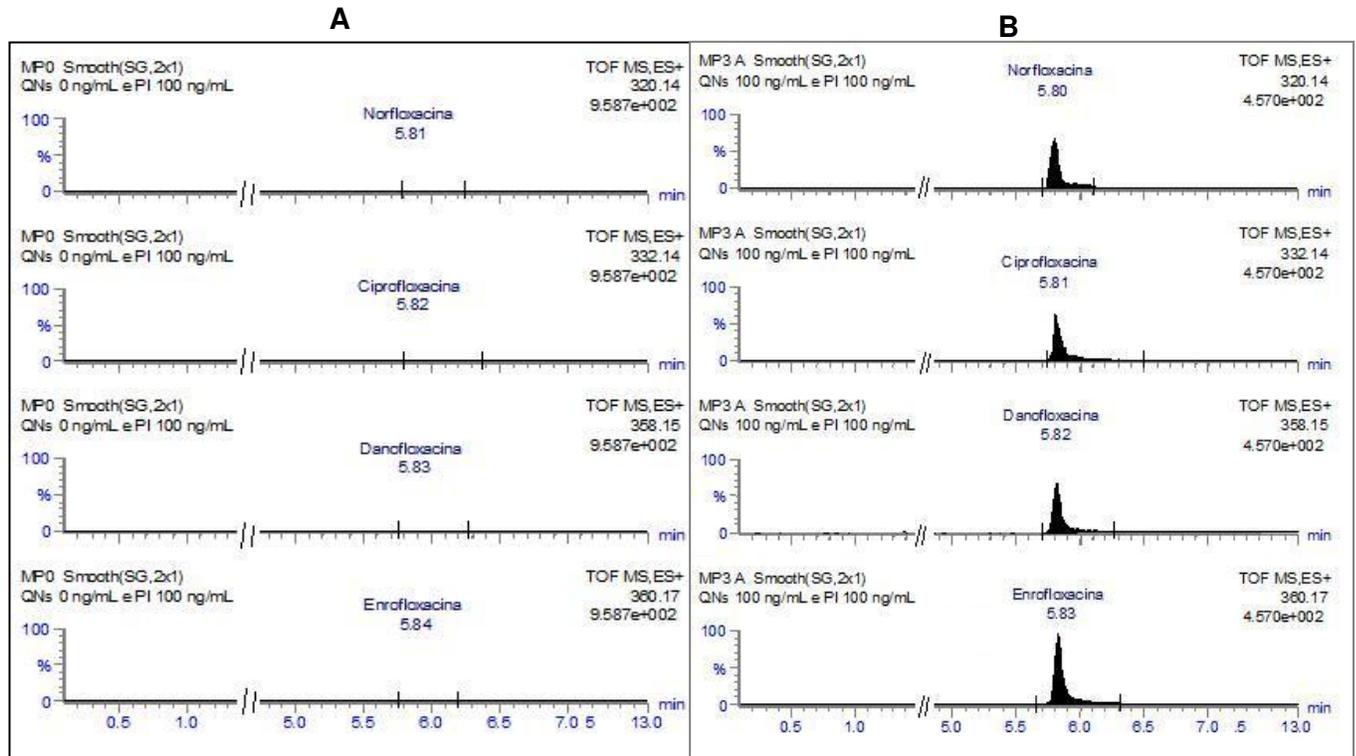


Figura 4. Comparação de cromatogramas de amostras branco (A) e fortificadas (B) (100 ng g⁻¹) de filé de tilápia.

A precisão intra-dia foi avaliada utilizando-se tanto para amostras fortificadas nos níveis mencionados, como também, foi avaliada com amostras incorridas, porém, apenas para os analitos ENR e CIP. Tanto para as amostras fortificadas como para as amostras incorridas, a precisão intra-dia foi obtida a partir de triplicatas ($n=3$), com as amostras processadas e analisadas em um mesmo dia. O processo foi repetido em três dias diferentes, e a precisão intra-dia foi expressa como a média dos coeficientes de variação (CV, %) obtidos para as triplicatas das análises realizadas em cada um dos dias.

A precisão inter-dias foi obtida a partir das mesmas análises realizadas com as amostras fortificadas para a obtenção da precisão intra-dia. No entanto, o resultado foi expresso como o CV das médias calculadas a partir das triplicatas analisadas em cada um dos dias.

Os guias de validação da Comunidade Europeia (EC, 2002) e do MAPA (2011) recomendam que os valores de CV (%) da precisão devam ser inferiores a 20% para compostos em níveis de concentração inferiores a 100 ng g^{-1} , o que, conforme pode ser observado na Tabela 2, foi obtido para todos os analitos.

A avaliação da exatidão pode ser obtida utilizando um Material de Referência Certificado (MRC) ou comparando os resultados obtidos com os resultados advindos do emprego de outro método já devidamente validado. Por não haver um MRC disponível para as FQ estudadas nas matrizes selecionadas, e por não se poder contar com um outro método já validado para as análises envolvidas neste estudo, a exatidão foi avaliada a partir de ensaios de recuperação (%), o que também é uma alternativa sugerida pelos guias de validação (EC, 2002; MAPA, 2011) para o cálculo da exatidão.

Como se pode observar a partir das Tabelas 2 e 3, os resultados obtidos para todas as FQ tanto no pacu como na tilápia, estão na faixa de 90-110%, o que satisfaz as recomendações dos guias da EC (2002) e do MAPA (2011). As recuperações obtidas foram semelhantes às relatadas por outros autores como SAMANIDOU *et al.* (2008), PASCHOAL *et al.* (2009) e YU *et al.* (2012).

A avaliação do LOD e LOQ para determinação de resíduos de fármacos veterinários em alimentos não é contemplada pela Comunidade Europeia (2002) nem pelo MAPA (2011). Porém, há outros guias de validação (FAO, 1997; FDA, 2001; IUPAC, 2002) que recomendam a determinação desses parâmetros tomando-se como base, a razão sinal/ruído de amostras branco, nos tempos de retenção correspondentes aos dos analitos. O LOD foi estabelecido a partir da razão sinal/ruído igual a 3, avaliando amostras branco em triplicata ($n=3$). O LOQ foi estabelecido a partir da razão sinal/ruído igual a 10,

também em triplicata ($n=3$). Os resultados são apresentados nas Tabelas 2 e 3, onde se pode observar que os valores de LOQ (25 ng g^{-1}) foram significativamente inferiores aos LMR estabelecidos para os analitos (100 ng g^{-1}), o que comprova a qualificação do método estabelecido no presente estudo para a determinação de resíduos de FQ em amostras de filé peixes.

O limite de decisão ($CC\alpha$) é um parâmetro que leva em conta a precisão do método para o estabelecimento de um nível crítico de referência, a partir do qual se pode concluir que uma amostra é classificada como não conforme, com uma probabilidade de erro de 5 % ($\alpha = 5\%$). Porém, para que uma amostra não conforme possa ter sua concentração e sua identidade confirmadas com uma probabilidade de erro de 5% ($\beta = 5\%$), é calculado um outro parâmetro crítico denominado capacidade de detecção ($CC\beta$). Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ obtidos para cada um dos analitos, através do método analítico estabelecido no presente estudo, são apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Todo o procedimento de otimização do processo de extração da FQ em filé de peixe foi realizado empregando-se como matriz branco, filés de pacu. Porém, para se verificar se o mesmo método pode ser empregado de forma satisfatória em análises das mesmas FQ em filé de tilápia, alguns parâmetros de validação precisam ser avaliados.

Segundo os guias de validação da EC (2002) e do MAPA (2011), a extensão do escopo do método analítico validado, incluindo sua aplicabilidade em uma nova matriz, precisa ser avaliada a partir dos seguintes parâmetros: linearidade, seletividade/efeito matriz, recuperação e exatidão. Se ficar constatado que com a nova matriz o método apresenta desempenho similar ao apresentado com a matriz com a qual ele foi originalmente validado, dispensam-se os estudos de precisão. Como pode ser verificado através da Tabela 3, os parâmetros avaliados para a matriz tilápia são semelhantes aos obtidos para a matriz pacu, comprovando a versatilidade do método para ambas as espécies de peixes.

Análises de amostras disponíveis no comércio

As amostras de peixes frescos de ambas as espécies, pacu e tilápia, foram coletadas em estabelecimentos comerciais de diferentes cidades (São José dos Campos, Piracicaba, Campinas), do Estado de São Paulo, Brasil. Ao todo, foram analisadas 31 amostras, dentre as quais 18 eram de tilápias e 13 de pacu. Nenhuma das amostras apresentaram resultado positivo (concentração superior ao LOD) para as FQ estudadas. No entanto, é necessário esclarecer que os resultados obtidos não podem ser

considerados representativos em relação ao total de peixes frescos comercializados no Estado de São Paulo, pelo fato de o número de amostras analisados ser relativamente baixo (n=31).

Conclusões

O emprego da técnica de LC-MS/MS, composta por um sistema híbrido de analisadores de massas (QToF), ainda que consistindo em um equipamento (QToF Micro®) de baixa resolução (< 10.000), porém com alta capacidade de exatidão de massas (erro < 10 ppm), permitiu que o método analítico estabelecido suprisse as recomendações quanto ao número de IP estabelecidos pelos guias de validação (EC, 2002; MAPA, 2011) tomados como referência no presente estudo.

Os parâmetros de validação avaliados para o método comprovam que o mesmo é adequado para ser empregado na determinação de resíduos de DAN, NOR, ENR e CIP em filés de pacu e tilápia mesmo em baixos níveis de concentração, considerando os LMR de 100 ng g⁻¹ adotado para cada um desses compostos, com precisão e exatidão adequadas.

A precisão do método pode ser avaliada utilizando-se amostras incorridas para ENR e CIP, o que contribui para a comprovação da aplicabilidade do método em amostras desconhecidas.

O método analítico apresentou versatilidade para a determinação de resíduos de DAN, NOR, ENR e CIP tanto em filé de pacu como de tilápia, mesmo diante de uma marcada diferença na composição de gordura dessas matrizes, já que o filé de pacu contém um teor de lipídeos cerca de quatro vezes maior do que no filé de tilápia.

Ainda que as amostras disponíveis comercialmente, não tenham apresentado resultado positivo para a presença das FQ estudadas, o número amostrado é baixo (n= 31) para que se possa esboçar uma conclusão sobre o uso ou não desses antimicrobianos na criação de tilápias e pacus no Estado de São Paulo, Brasil.

Referências

- BARNES A., LEWIN C., HASTINGS T., AMYES S. 1990. Cross resistance between oxytetracycline and oxolinic acid in *Aeromonas salmonicida* associated with alterations in outer membrane proteins. *FEMS Microbiology Letters*. 72: 337-339.
- BARNES A., AMYES S., HASTINGS T., LEWIN C. 1991. Flouroquinolonas display rapid bactericidal activity and low mutation frequencies against *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Food Diseases*. 14 (6): 661-667.
- BRITSKI H., SILIMON K., LOPES B., 1999. Peixes do Pantanal. Embrapa.
- BUFFÉ C., ARAÚJO B., DALLA COSTA T. 2001. Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos na otimização de terapias antimicrobianas. *Caderno de Farmácia*. 17 (2): 97-109.
- CABELLO F. 2003. Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Revista Médica Chile*. 132: 1001-1006.
- EC 2002. European Commission, Official Journal of the European Communities, 17/08/2002, L221/8-36. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/ifsi/eupositions/ccrdvf/archives/ccrdvf_ec-comments_03_item11a_en.pdf>. Acessada: 25/07/2012.
- EC. 1996. COUNCIL DIRECTIVE 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC, 1996, 10–32. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/council_directive_96_23ec.pdf>. Acessada: 25/07/2012.
- EMEA. 2008. European Medicines Agency: Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014151.pdf>. Acessada em: 25/07/2012.
- FAO. Estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma. 2010.
- FAO. 1997. Validation of Analytical Methods for Food Control. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Food and Nutrition Paper, no. 68. Joint FAO/IAEA Expert Consultation, Vienna. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/w8420e/w8420e00.pdf>>. Acessada em: 25/07/2012.
- FDA. 2001. United States Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Department of Health and Human Services. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>>. Acessada em: 25/07/2012.
- GOMEZ F. 2011. Uso racional de los antibióticos. Jornadas Profesionales de Avicultura – Real Escuela de Avicultura. España.
- HASHIMOTO J., PASCHOAL J., QUEIROZ J., REYES F. 2011. Considerations on the Use of Malachite Green in Aquaculture and Analytical Aspects of Determining the Residues in Fish: A Review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 20: 273 – 294.
- HASHIMOTO J., PASCHOAL J. 2012. A Simple Method for the Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green Residues in Fish by a Modified QuEChERS Extraction and HPLC/MS/MS. *Journal of AOAC International*. 95 (3): 1-10.

- HERNANDO M., MEZCUA M., SUÁREZ-BARCENA J., FERNÁNDEZ-ALBA A. 2006. Liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry for simultaneous determination of chemotherapeutant residues in salmon. *Analytica Chimica Acta*. 562: 176-184.
- IEL/NC-SEBRAE. 2005. O NOVO CICLO DA CANA: Estudo sobre a competitividade do sistema agroindustrial da cana-de-açúcar e prospecção de novos empreendimentos. Brasília, Brasil.
- INGLIS V., RICHARDS R. 1991. The in vitro susceptibility of *Aeromonas salmonicida* and other fish-pathogenic bacteria to 29 antimicrobial agents. *Journal of Food Diseases*. 14 (6): 641-650.
- INMETRO. 2003. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, Disponível em: < http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acessada em: 25/07/2012.
- IUPAC. 2002. UNIÃO INTERNACIONAL DE QUÍMICA PURA E APLICADA: Compendium of Chemical Terminology – Gold Book, Disponível em: < <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf> >. Acessada em: 27/06/2012.
- JUAN-GARCÍA A., FONT G., PICÓ Y. 2006. Determination of quinolone residues in chicken and fish by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis*. 27: 2240-2249.
- KINSELLA B., O'MAHONY J., MALONE E., MOLONEY M., CANTWELL H., FUREY A., DANAHER M. 2009. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 1216: 7977-8015.
- LIM C. WEBSTER C. 2001. *Nutrition and Fish Health*, Editora: Taylor & Francis, Editores: Lim C., Webster C. Brady Y., Primeira edição, Portland, EUA, p. 13.
- MAPA. 2011. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Guia%20de%20valida%C3%A7%C3%A3o%20e%20controle%20de%20qualidade%20analitica.pdf>, Acessada em: 30/07/2012.
- MARTINSEN B., MYHR E., REED E., HÅSTEIN T. 1991. In vitro antimicrobial activity of sarafloxacin against clinical isolates of bacteria pathogenic to fish. *Journal Aquatic Animal Health*, 3: 235–241.
- MAZZUCHELLI F., RODRÍGUEZ M. 1997. Líneas generales para la terapéutica y la profilaxis de los procesos respiratorios bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria*, n.17, v. 10, p.46-50.
- MPA 2012. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2010. Brasília.
- MENDES M. 2007. Qualidade nutricional da fração lipídica de espécies de peixes da região pantaneira de mato grosso do sul. Tese (Doutor em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Brasília.
- MELLA S., ACUÑA G., MUÑOZ M., PEREZ C., LABARCA J., GONZALES G., BELLO H., DOMINGUEZ M., ZEMELMAN R. 2000. Quinolones: General characteristics of structure and classification. *Revista Chilena Infectologia*. 17 (1): 53-66.
- MCEWEN S., FEDORKA-CRAY P. 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.* 34 (3): 93-106.

- NIGHTINGALE C., QUINTILIANI R., NICOLAU D. 1994. Intelligent Dosing of Antimicrobials. *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*, 14: 252-265.
- OIE. 2003. Organização Internacional das Epizootias. Manual de Testes Diagnósticos para Animais Aquáticos. França. Disponível em: <<http://www.oie.int/doc/ged/D6505.PDF>>. Acessada em: 05/04/2012.
- OLIVEIRA R. 2009. O Panorama da Aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, 2 (1): 73-89.
- PASCHOAL J., REYES F., RATH S. 2009. Quantitation and identity confirmation of residues of quinolones in tilapia fillets by LC-ESI-MS-MS QToF. *Anal. Bioanal. Chem.*, 394: 2213–2221.
- PASCHOAL J., REYES F., RATH S. 2009. Determination of quinolone residues in tilapias (*Oreochromis niloticus*) by HPLC/FLD and LC-MS/MS QToF. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 26: 1331–1340.
- PAVANELLI G., EIRAS J., TAKEMOTO R. 1998. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Ed. UEM, p. 264.
- PEREIRA R. 2012. Desenvolvimento e validação de métodos multirresíduos para determinação de medicamentos veterinários em alimentos e em ração utilizando CL-EM/EM. Tese de doutorado, UFMG-ICE, Belo Horizonte, p. 101.
- PRESTES O., FRIGGI C., ADAIME M., ZANELLA R. 2009. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*, São Paulo, 32 (6): 1620-1634.
- RANZANI-PAIVA M., ISHIKAWA C., CAMPOS B. 1997. Hematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus*, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 14: 329-339.
- RHODES G, HUYS G, SWINGS J, MC GANN P, HINEY M, SMITH P ET AL. 2000. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Appl Environ Microbiol*, 66: 3883-3890.
- ROBERTS R. 1981. *Patologia de los peces*, 2ªed. Madri: Ediciones Mundi Prensa, p. 366.
- ROTTA A., QUEIROZ F. 2003. Boas práticas de manejo (BPMs) para a produção de peixes em tanques-redes. *EMBRAPA*, 47: 27.
- SAMANIDOU V., EVAGGELOPOULOU E., TRÖTZMÜLLER M., GUOB X., LANKMAYR E. 2008. Multi-residue determination of seven quinolones antibiotics in gilthead seabream using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1203 (2): 115-123.
- SENASICA. 2007. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Tilapia para la Inocuidad Alimentaria. México.
- SCHMIDT A., BRUUN M., DALSGAARD I., LARSEN J. 2001. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Appl Environ Microbiol*, 67: 5675 – 82.
- SONGSERMSAKUL P., RAZZAZI-FAZELI E. 2008. A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins. *Journal Liquid Chromatography & Related Technologies*. 31: 1641-1686.

- SORUM H, L'ABEE-LUND T. 2002. Antibiotic resistance in food related bacteria, a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *Int J Food Microbiol*, 78:43 - 56.
- SORUM H. 2009. Mobile drug resistance genes among fish bacteria. *APMIS Acta*, 637: 68 – 78.
- STOLKER A., BRINKMAN U. 2005. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. *Journal of Chromatography A*, 1067:15-53.
- STUBBINGS G., BIGWOOD T., 2009. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Analytica Chimica Acta*, 637: 68-78.
- TAVARES W. 1996. *Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos*. 2ªed, Brasil.
- WHO. 1998. World Health Organization. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Report of a WHO Meeting – Emerging and other communicable diseases, surveillance and control. Geneva, Sw June/1998. Disponível em: < http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO EMC_ZDI_98.10.pdf>. Acessada em: 25/07/2012.
- WOO P., BRUNO D. 2011. *Fish: Diseases and Disorders*, Vol 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. 2ªed. p. 456.
- YU H., TAO Y., CHEN D., PAN Y., LIU Z., WANG Y., HUANG L., DAI M., PENG D., WANG X., YUAN Z. 2012. Simultaneous determination of fluoroquinolones in foods of animal origin by a high performance liquid chromatography and a liquid chromatography tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction. *Journal of Chromatography B*, 885: 150-159.

CONCLUSÃO GERAL

O método apresentado neste trabalho empregou a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial LC-MS/MS, composta por um sistema híbrido de analisadores de massas (QToF), para a análise de determinação de resíduos das fluoroquinolonas DAN, NOR, ENR e CIP em filé de pacu e de tilápia. O método analítico apresentou versatilidade nas análises dos filés estudados, mesmo diante de uma marcada diferença na composição de gordura dessas matrizes, já que o filé de pacu apresenta um teor de lipídeos cerca de quatro vezes maior do que no filé de tilápia. Na validação do método desenvolvido, todos os parâmetros determinados mostraram conformidade com as Guias de Validação de Métodos Analíticos tanto da Comunidade Europeia (EC, 2002), como do MAPA (2009). As análises de amostras de peixe, pacu e tilápia (n=31) disponíveis comercialmente no estado de São Paulo, Brasil, mostraram que eles não possuem resíduos das FQ estudadas em níveis detectáveis.