



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

LIXIVIAÇÃO DE RAÇÃO MEDICADA COM FLORFENICOL PARA TILÁPIA

Sóstenes Giovanni de Oliveira **Bueno**¹; Fabíola Málaga **Barreto**²; Felix Guillermo Reyes **Reyes**³;
Hamilton **Hisano**⁴

Nº 17420

RESUMO – Com a intensificação da aquicultura, o surgimento de bacterioses está cada vez mais frequente e o uso de antimicrobianos é recorrente para o controle destas enfermidades. O florfenicol tem sido um dos fármacos mais utilizados para esta finalidade, entretanto, a administração oral por meio da ração medicada pode resultar na sua lixiviação para a água, o que representa não só um problema para a saúde animal, mas também um risco potencial para o ambiente aquático. O objetivo do presente experimento foi avaliar a lixiviação do florfenicol de ração medicada em diferentes condições de temperatura (22°C e 28°C) e tempo de exposição na água (1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15 e 30 minutos) sob agitação constante. Os dados experimentais foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e complementadas com o teste t Student ($P < 0,05$) para comparação das diferentes temperaturas. Para todos os tempos, houve diferença ($P < 0,05$) da perda por lixiviação do florfenicol, quando comparado as diferentes temperaturas avaliadas, que simulam uma média de temperatura da água no inverno e verão. Por outro lado, o comportamento de lixiviação do florfenicol na água foi acentuado até 15 minutos. Estas informações permitem concluir que a perda por lixiviação do florfenicol é maior na temperatura de 28°C, em comparação com 22°C em todos os períodos avaliados, e que existe influência do tempo em contato com a água da ração medicada na lixiviação deste fármaco.

Palavras-chaves: antibiótico, aquicultura, impacto ambiental.

1 Autor, Bolsista Embrapa: Graduação em Ciências Biológicas, PUC-Campinas, Campinas-SP;

2 Colaborador: Doutoranda em Ciências de Alimentos na Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas-SP;

3 Colaborador: Professor da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências de Alimentos, Unicamp, Campinas-SP;

4 Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; hamilton.hisano@embrapa.br



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

ABSTRACT – *Bacterial infections are becoming more frequent due aquaculture intensification, and the use of antimicrobials have been more common to control these diseases. Florfenicol has been one of the most used drugs for this purpose; however the oral administration through pelleted diets can result in its leaching into the water, becoming not only an issue to the animal health, but also to the environment. The objective of this study was to assess the florfenicol leaching in medicated diets in different water temperatures (22°C and 28°C) and exposure times (1;2;3;4;5;7,5;10;12,5;15;30 min) under constant agitation. Experimental data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and complemented with t Student's test ($P<0.05$). To different times, there was difference ($P<0.05$) in florfenicol leaching losses, when compared the different temperatures evaluated, that simulate an average temperature in winter and summer. On the other hand, the behavior of florfenicol leaching in water was outstanding until 15 minutes. Florfenicol leaching losses is higher at 28°C in comparison with 22°C in all periods evaluated, and that exist influence of contact time in water of medicated diets in drug leaching.*

KEY WORDS: antibiotic, aquaculture, environmental impact

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura brasileira está progredindo de forma significativa nas últimas décadas, acompanhando a tendência mundial de crescimento. Somente entre os anos de 2008 e 2010 o crescimento no setor foi de 30% (MPA, 2010). Nos anos seguintes, o crescimento da atividade seguiu esta tendência. Em 2009, o Brasil ocupou a 18ª posição no *ranking* mundial na produção aquícola, em 2014 se enquadrou na 11ª posição, totalizando uma produção de 562,5 mil toneladas, sendo aproximadamente 85% relativo a produção de peixes (MPA, 2010; FAO, 2012; FAO 2016).

A aquicultura continental predomina no país, com destaque para a produção de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). Esta espécie exótica, originária da África, adaptou-se as diversas condições climáticas encontradas no Brasil, sendo produzida em quase toda a extensão nacional. Os sistemas de piscicultura atuais mais utilizados são o intensivo e semi-intensivo, que apesar de gerar aumento na produtividade, expõe os animais a situações de estresse constantes (OSTRENSKY et al., 2008). Diante de situações estressantes, a produção do hormônio responsável por induzir a imunossupressão (cortisol) é aumentada, e como consequência, os peixes tornam-se mais vulneráveis a patógenos presentes no meio aquático (CYRINO, 2010). Para controlar e prevenir estes problemas, o uso de antimicrobianos é frequente na aquicultura.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

O florfenicol é um dos antibióticos mais usados na aquicultura mundial (NORAMBUENA, 2013), e um dos poucos registrados para uso no Brasil. Este fármaco é prescrito no tratamento de tilápia com quadro de septicemia hemorrágica causada por *Aeromonas* sp. e *Streptococcus agalactiae* e indicado para o tratamento de truta arco-íris com doença da boca vermelha causada por *Yersinia ruckeri* (SCHERING-PLOUGH, 2015). Assim como outros antimicrobianos, a forma mais usual de administração do florfenicol é por meio do recobrimento da ração com o medicamento com auxílio de um veículo para melhorar o espalhamento, geralmente, óleo vegetal ou óleo de peixe. Porém, esta técnica, apesar de ser mais eficiente e prática que aplicação por imersão, apresenta algumas desvantagens, como dificuldade de homogeneização e perda do fármaco para água (ZARZA, 2012).

A lixiviação de antimicrobianos para o ambiente aquático é um problema de saúde pública, pois possibilita o desenvolvimento de bactérias resistentes. Estes microrganismos, em contato com subdosagem de um determinado fármaco, podem desenvolver mecanismos adaptativos que lhes conferem resistência às drogas e o gene de resistência adquirido pode ser transferido para outras bactérias (transferência horizontal). O ambiente aquático funciona como um reservatório de genes resistentes, e a transferência destes não fica restrita ao meio onde estão inseridos, podendo atingir outras espécies animais fora do ambiente de criação, incluindo os humanos (FAO, 2006; CABELLO, 2006; KUMMERER, 2009; STOLL et.al., 2012).

Estudos sobre a lixiviação de antimicrobianos são escassos na literatura mundial, e até o presente momento desconhecemos alguma avaliação do comportamento da ração medicada com florfenicol no ambiente aquático. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento da ração medicada com florfenicol, em diferentes condições de temperatura e tempo de exposição na água e gerar informações sobre perdas por lixiviação deste fármaco.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e padrões

O padrão analítico de florfenicol foi obtido da Sigma-Aldrich (China). Acetonitrila e metanol (grau HPLC) foram de procedência da JT Baker (México). Para o preparo da fase móvel e das soluções foi utilizada água ultrapura obtida de um sistema de purificação de água da marca Millipore Merck (Darmstadt, Alemanha). O ácido fórmico (98%) e sulfato de magnésio (MgSO₄) foram procedentes da Sigma Aldrich® (Alemanha/ Japão), o Dodecil - C18 foi adquirido da Varian® (USA).



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

Preparo da ração medicada

Foi adquirido em estabelecimento comercial uma ração específica para tilápia (4-6 mm de diâmetro) e o medicamento contendo florfenicol na forma de premix 50%. O preparo da ração medicada ocorreu da seguinte forma: após adicionar a quantidade de medicamento desejada ao óleo vegetal 2% (v/m) a solução foi homogeneizada e vertida sobre a ração em uma mini drageadeira de bancada (Modelo LM-DR Lemaq) com velocidade de rotação lenta. Após 5 minutos de homogeneização a ração contendo o fármaco foi retirada do equipamento e acondicionada.

Determinação de florfenicol

Extração

O florfenicol das rações medicadas foi extraído com acetonitrila. Para 1 grama da ração adicionou-se 5 mL de acetonitrila. Após homogeneização no ultraturrax por 30 segundos e centrifugação por 2 minutos a 10000 rpm (centrífuga modelo 5810R, Eppendorf), uma alíquota de 1 ml do extrato foi retirada e submetida à etapa de *clean-up*. Para isso, foram adicionados 150 mg de MgSO₄ e 50 mg de Dodecil- C18, seguido de agitação, centrifugação, filtração e diluição do extrato antes da análise cromatográfica.

As amostras de água coletadas após os experimentos de lixiviação também foram analisadas em relação à concentração de florfenicol. Para isso, as amostras foram filtradas e injetadas no cromatógrafo.

Determinação analíticas

As análises da concentração do florfenicol na água e na ração foram realizadas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). A separação cromatográfica foi realizada em sistema Agilent UHPLC 1290 (Agilent Technologies, CA, USA), composto por bombas quaternárias, injetor automático e termostato para coluna e para amostrador. O espectrômetro de massas utilizado foi um triplo quadrupolo Agilent 6460, usando fonte de ionização ESI (Electrospray Ionization) em modo negativo.

Os métodos cromatográficos foram validados seguindo o Guia de Validação e controle de qualidade analítica: fármacos e produtos para alimentação medicamentos veterinários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011).



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

Avaliação da lixiviação do florfenicol presente na ração medicada

No ensaio de lixiviação foi avaliado a quantidade de fármaco perdido da ração medicada para água (pH 7,0) durante os diferentes tempos de contato: 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 30 minutos em duas temperatura distintas: 22°C e 28°C, definidas com temperaturas encontradas no inverno e verão para a produção de tilápia (MARENGONI, 2006). Para esse ensaio amostras de 25 g de ração medicada foram colocadas em Erlenmeyer com capacidade para 2 litros contendo 500 ml de água sob agitação a 80 rpm em agitador com temperatura controlada (New Brunswick Innova 4900). Depois de decorrido os tempos propostos foram retiradas alíquotas de água e reservada para análise.

Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados foi aplicado o teste de normalidade e as médias foram submetidas análise de variância (ANOVA), e quando significativas aplicou-se o teste t Student a 5% de significância para comparação das diferentes temperaturas. As análises foram realizadas no programa estatístico SAS (SAS, 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram preparados três lotes de mesmo tamanho da ração (4-6 mm de diâmetro) recobertas com óleo vegetal e medicamento, e de cada um deles foram separadas vinte alíquotas (1g) para análise do teor de florfenicol com a finalidade de se avaliar as possíveis perdas do fármaco durante o processo de recobrimento, assim como a homogeneidade das amostras. Em todos os tratamentos, a concentração encontrada do fármaco foi menor que a concentração adicionada, indicando perda no processo de recobrimento.

Constatou-se que essa perda ocorre em dois momentos: a) durante a homogeneização do medicamento com o veículo e b) durante a homogeneização dessa suspensão (medicamento + veículo) com a ração. As perdas são visivelmente percebidas quando vertemos o preparado sobre a ração (parte dele fica retida no recipiente utilizado para seu preparo enquanto que outra porção fica retida na parede da drageadeira). O teor do fármaco encontrado no produto final foi 7% menos que o adicionado. O resultado das alíquotas analisadas apresentou coeficiente de variação de 27%, demonstrando que a distribuição nessa forma de recobrimento não é homogênea. Isto sugere que um *pellet* pode conter medicamento excessivo enquanto outro pode conter muito pouco, o que dificulta a dosagem correta do fármaco ao animal.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

Por outro lado, quando foi considerado todos os tempos avaliados foi possível observar diferença ($P < 0,05$) da perda por lixiviação do florfenicol em todos os tempos, quando comparado as diferentes temperaturas avaliadas (22°C e 28°C), que simulam uma média de temperatura da água no inverno e verão. Por outro lado, o comportamento de perda por lixiviação do florfenicol foi acentuado até 15 minutos. Nas duas temperaturas avaliadas a lixiviação foi progressiva ao passar do tempo, ou seja, quanto maior o tempo de exposição, maior quantidade do fármaco foi perdida para o meio sendo que a temperatura mais elevada acelerou o processo. Na figura 1, pode-se observar a porcentagem de fármaco lixiviado para água nas diferentes temperaturas ao decorrer do tempo.

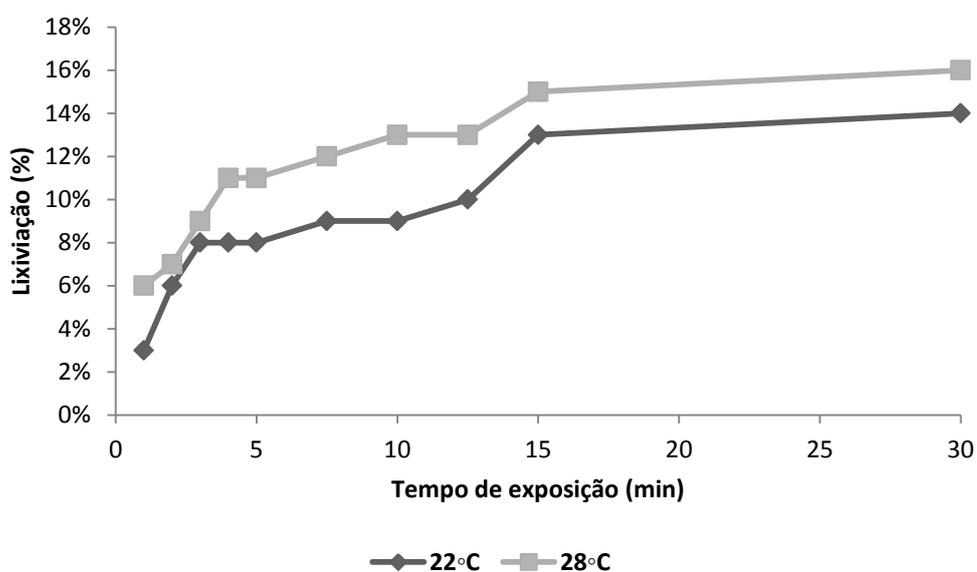


Figura 1. Concentração da lixiviação do florfenicol em função do tempo em diferentes temperaturas.

Estudos farmacocinéticos em tilápias demonstraram que o florfenicol é absorvido facilmente pela espécie, atingindo concentrações plasmáticas superiores a concentração mínima inibitória (MIC) de bactérias comumente responsáveis por infecções bacterianas, porém estes estudos não levam em consideração a real dose absorvida pelos animais durante a medicação via alimentação uma vez que o ensaio é conduzindo introduzindo o medicamento diretamente no esôfago, via gavagem (FENG et. al. 2016).

Os animais doentes tem o apetite alterado, e geralmente consomem menos e levam mais tempo para ingerir o alimento. Dessa forma, o fármaco fica mais tempo em contato com a água aumentando a lixiviação e contaminando ainda mais o meio (SERRANO et. al, 2005). Essas



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

observações sugerem não só um problema para a saúde animal, uma vez que a dose correta do medicamento poderá não estar disponível para os benefícios terapêuticos, mas também um risco potencial tanto para o ambiente quanto para o homem.

4 CONCLUSÃO

As informações obtidas neste ensaio permitiram quantificar algumas perdas na incorporação do florfenicol na ração, e principalmente por lixiviação, que devem ser consideradas para o uso responsável deste antimicrobiano em rações de (4-6 mm) para peixes. Assim, algumas estratégias de alimentação deverão ser revisadas, assim como discussões mais abrangentes em relação ao impacto ambiental deste fármaco no ambiente aquático. Estas informações permitem concluir que a perda por lixiviação do florfenicol é maior na temperatura de 28°C, em relação a 22°C em todos os períodos avaliados, e que existe influência do tempo em contato com a água da ração medicada na lixiviação deste fármaco.

5 AGRADECIMENTOS

À Embrapa pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor e ao Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pela utilização dos equipamentos necessários para a realização do experimento.

6 REFERÊNCIAS

- CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*. v. 8, p. 1137 – 1144, Jul. 2006.
- CYRINO, J. E. P.; BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J. K. A piscicultura e o ambiente - o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, p. 68-87, 2010.
- FAO, Food and Agriculture Organization. *The State of World Fisheries and Aquaculture Rome*, 2006.
- FAO, Food and Agriculture Organization. *The State of World Fisheries and Aquaculture Rome*, 2012.
- FAO, Food and Agriculture Organization. *The State of World Fisheries and Aquaculture Rome*, 2016.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

FENG, J.-B. et al. Pharmacokinetics of florfenicol and behaviour of its metabolite florfenicol amine in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) after oral administration. *Journal of fish diseases*, 2016.

KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, v. 75, p. 417- 434, 2009.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011. Guia de Validação e controle de qualidade analítica: fármacos e produtos para alimentação medicamentos veterinários. Disponível em: <<https://bibliotecaquimicaufmg2010.files.wordpress.com/2012/02/guia-de-validac3a7c3a3o-e-controle-de-qualidade-analc3adtica.pdf>>. Acesso em junho de 2017.

MARENGONI, N. G. Produção de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (linhagem chitralada), cultivada em tanques-rede, sob diferentes densidades de estocagem. *Archivos de Zootecnia*, v. 55, n. 210, p. 127-138, 2006.

MPA, Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Brasil 2010. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br>>.

NORAMBUENA, L.; GRAS, N.; CONTRERAS, S. Development and validation of a method the simultaneous extraction and separate measurement of oxytetracycline, florfenicol, oxolinic acid and flumequine from marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, v. 73, p. 154-160, 2013.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. *Aquicultura no Brasil, o desafio é crescer*. 276p. Edição: Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca, Brasília, 2008.

SCHERING-PLOUGH. Aquaflor product information (Schering-Plough Aquaculture). Disponível em: <<http://www.spaquature.com>>. Acesso em Setembro 2015.

SERRANO, P. H. Responsible use of antibiotics in aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Rome, 2005.

STOLL, C. et al. Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water Samples collected from Germany and Australia. *Environmental Science Technology*, v.46, n.17, p.9716- 9726, Jul. 2012.

ZARZA, C. Oral delivery of veterinary medicines through aquafeed in Mediterranean aquaculture. Retirado de FAO (Food and Agriculture Organization) Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. p. 127-140, 2012.