



Métodos de avaliação do acúmulo e da depuração de drogas veterinárias de interesse na aquicultura



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio Ambiente
Ministério da Agricultura e Pecuária**

DOCUMENTOS 138

Métodos de avaliação do acúmulo e da depuração de drogas veterinárias de interesse na aquicultura

*Claudio Martín Jonsson
Vera Lucia Ferracini
Sonia Cláudia do Nascimento de Queiroz
Hamilton Hisano
Lourival Costa Paraíba*

Embrapa Meio Ambiente
Jaguariúna, SP
2023

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP-340, Km 127,5, Tanquinho Velho
CEP: 13918-110, Jaguariúna, SP
Fone: +55 (19) 3311-2700
<https://www.embrapa.br/meio-ambiente/>
<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente

Janaina Paula Marques Tanure

Secretário-Executivo

Anderson Soares Pereira

Membros

Janaina Paula Marques Tanure, Cristiano Menezes, Aline Telles Biasoto Marques, Alfredo José Barreto Luiz, Marcos Eliseu Losekann, Maria Cristina Tordin, Maria de Cléofas Faggion Alencar, Nilce Chaves Gattaz, Priscila de Oliveira, Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz e Victor Paulo Marques Simão

Revisão de texto

Eliana de Souza Lima

Normalização bibliográfica

Victor P. M. Simão

Editoração eletrônica

Silvana Cristina Teixeira

Foto da Capa

Hamilton Hisano

1ª edição

2023

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Meio Ambiente

Métodos de avaliação do acúmulo e da depuração de drogas veterinárias de interesse na aquicultura / Claudio Martin Jonsson... [et al.]. – Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2023.

PDF (29 p.) – (Documentos / Embrapa Meio Ambiente, e-ISSN 2965-7342; 138).

1. Medicamento veterinário. 2. Peixe. 3. Bioconcentração. 4. Bioacumulação. 5. Resíduo de medicamento veterinário. 6. Metodologia analítica. I. Jonsson, Claudio Martin. II. Ferracini, Vera Lucia. III. Queiroz, Sonia Claudia do Nascimento de. IV. Hisano, Hamilton. V. Paraíba, Lourival Costa. XI. Série.

CDD (21. ed.) 363.192

Victor Paulo Marques Simão (CRB-8/5139)

© Embrapa, 2023

Autores

Claudio Martín Jonsson

Farmacêutico, doutor em Biologia Funcional e Molecular, pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

Vera Lucia Ferracini

Química, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz

Química, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

Hamilton Hisano

Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

Lourival Costa Paraíba

Matemático, doutor em Matemática Aplicada, pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

Apresentação

A aquicultura mundial continua em plena expansão, simultaneamente com um aumento no consumo de pescado, que é considerado uma fonte proteica de alto valor biológico e de outros nutrientes para a saúde humana. Para suprir esta demanda, os sistemas de produção aquícola tornaram-se mais intensivos. Esta intensificação pode induzir maior ocorrência de doenças por agentes patogênicos que devem ser controlados com o uso de drogas veterinárias. Como consequência, os resíduos desses compostos em produtos animais podem prejudicar a saúde humana, quando os seus níveis estão acima dos limites máximos permitidos.

Portanto, em decorrência da geração de resíduos de drogas veterinárias em produtos da aquicultura é necessária a descrição de metodologias que estabeleçam parâmetros de acúmulo e depleção dessas drogas nos tecidos dos organismos.

As metodologias descritas no presente documento poderão auxiliar laboratórios de pesquisa que estudem moléculas com uso promissor na aquicultura, assim como laboratórios credenciados na geração de dados para o registro de moléculas a serem comercializadas. Os produtores poderão se beneficiar através dos resultados gerados por estas metodologias, de modo que possam adotar um período de carência apropriado relacionado à depleção das drogas veterinárias dos tecidos antes do abate.

Assim sendo, o presente documento procurou reunir, simplificar e exemplificar procedimentos descritos na literatura juntamente com a experiência prática adquirida pelo Laboratório de Aquicultura e Ecotoxicologia e pelo Laboratório de Resíduos e Contaminantes na realização de estudos de avaliação de risco de agroquímicos e antibióticos. Estes argumentos constituíram os instrumentos orientadores que permitiram concluir as metodologias propostas em consistência com o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS 12) para assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis.

Ana Paula Contador Packer
Chefe-Geral da Embrapa Meio Ambiente

Sumário

Introdução.....	7
Definições.....	9
Avaliação da bioconcentração e do período de depleção de drogas veterinárias em peixes expostos através da água	10
Fundamento	10
Delineamento experimental em exposições através da água.....	10
Água de diluição	10
Solução-teste.....	10
Organismos-teste	11
Densidade	11
Temperatura e período de exposição	11
Amostragem	11
Avaliação do acúmulo e eliminação através da ingestão de uma ração medicada	13
Análise dos resultados da estimativa da bioconcentração e do período de depleção após a exposição a uma droga veterinária.....	15
Cálculo e aplicação das constantes cinéticas e do Fator de Bioconcentração.....	17
Estimativa da taxa de depuração k_2	17
Cálculo de k_1 e BCF	19
Aplicação do FBC na avaliação de risco da ingestão de alimento contendo a DV	20
Cálculo do período de depleção (Pd).....	21
Cálculo através da regressão linear simples utilizando o programa Excel	21
Cálculo através do uso de programa computacional promulgado pela União Europeia.....	23
Correção do período de depleção de acordo com a temperatura.....	24
Considerações Finais	25
Agradecimentos.....	25
Referências	26
Anexo 1	29

Introdução

Segundo dados da Organização das Nações Unidas (ONU), até 2040 haverá um aumento da população brasileira de aproximadamente 9% (Nações Unidas, 2019). Devido a esse crescimento, durante as últimas décadas o consumo per capita de fontes proteicas tem aumentado, em função do incremento da oferta, mudança de hábito do consumidor, avanço na tecnologia e melhoria na renda (FAO, 2022). Neste sentido, destaca-se o aumento no consumo de pescado, que é considerado uma fonte proteica de alto valor biológico e de ácidos graxos poli-insaturados com benefícios à saúde humana (Borghesi et al., 2013).

Em 2020, a produção mundial de pescado atingiu 178 milhões de toneladas, sendo que a aquicultura contribuiu com 88 milhões de toneladas (49%), gerando aproximadamente USD 265 bilhões em divisas (FAO, 2022). A aquicultura mundial continua em plena expansão desde a década de 80, embora com ritmo mais lento nos últimos dois anos (3,3% em 2018-2019 e 2,6% em 2019-2020), quando comparado a uma média de 4,6% ao ano durante o período 2010-2018 (FAO, 2022).

Por outro lado, a piscicultura, que é o principal segmento da aquicultura no Brasil, alcançou 841.005 toneladas, apresentando um crescimento de 4,7% em relação ao ano anterior (Associação Brasileira da Piscicultura, 2022).

O país tende a registrar um crescimento de 104% na pesca e na aquicultura até 2025. Isto é favorecido pelo consumo de peixes no Brasil que é de 14,4 kg por habitante por ano, valor maior do que o recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), de 12 kg por habitante por ano (Silva et al., 2019).

Para suprir esta grande demanda por pescados, os sistemas de produção têm se tornado mais intensivos. Entretanto, a intensificação pode induzir a uma maior ocorrência de infecções, pois a alta densidade de estocagem de organismos gera maior estresse; reduz a qualidade da água ao alterar os valores de pH, oxigênio e compostos nitrogenados; e aumenta o acúmulo de resíduos orgânicos na água e no sedimento. A propagação de bactérias como *Aeromonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Yersinia*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Shigella*, *Salmonella* e *Escherichia* (ALY et al., 2012) pode levar a infecções e ocasionar lesões superficiais na pele, brânquias, assim como danos em órgãos internos. Pode ocorrer também o aparecimento de crustáceos ectoparasitas causadores de epizootias, tais como *Lernaea cyprinacea* e *Dolops carvalhoi* (Maduenho; Martinez, 2008).

Assim, a utilização de drogas veterinárias na aquicultura é um poderoso recurso que tem sido aplicado em todo o mundo para garantir a saúde e a produção em larga escala. Como consequência, a presença de resíduos desses compostos em produtos animais pode ser prejudicial à saúde humana quando os níveis de resíduos estão acima dos teores máximos de resíduos permitidos no produto alimentício. Consequentemente, pode se exceder a ingestão diária aceitável do composto devido ao consumo desse produto alimentício.

Atualmente, os antibióticos autorizados para uso na aquicultura pelos órgãos competentes são oxitetraciclina, florfenicol, sarafloxacin, eritromicinas e sulfonamidas, potencializados com trimetropim e ormetropim (FAO, 2012). No Brasil, a aquicultura dispõe apenas de dois ingredientes antimicrobianos ativos licenciados, o florfenicol e a oxitetraciclina. Contudo, apenas o florfenicol é recomendado, especialmente para a criação de tilápia, (Compêndio..., 2016; Gozi, 2016). Por outro lado, o triclorfon é o único parasiticida recomendado para o tratamento de ectoparasitas no Brasil (Cardoso, 2007). Entretanto, suspeita-se que drogas veterinárias regulamentadas para

outras espécies, como bovinos, aves, suínos e até animais de estimação, estão sendo usadas nas atividades aquícolas.

Os procedimentos mais comuns de administração das drogas veterinárias em peixes são por meio de banhos de imersão e de incorporação na ração (Figueiredo, 2008). Os banhos são utilizados para tratamentos de formas jovens, ou em laboratórios, para o tratamento de uma quantidade menor de peixes. Este procedimento também é utilizado durante o transporte, o qual pode afetar negativamente a saúde dos peixes de diferentes maneiras. Uma delas é o dano no epitélio devido à abrasão com o “container”, resultante do movimento durante o transporte. Outra maneira pode ser ocasionada por uma reação fisiológica decorrente da maior atividade física e de outros fatores ambientais, como baixo oxigênio dissolvido. Tais danos e reações podem causar sérias debilitações com suscetibilidade a infecções (Mbawuike et al., 2017).

Assim, alguns produtores utilizam antibióticos de forma profilática na água de transporte dos peixes, a fim de impedir o desenvolvimento de bactérias (Sudarto et al., 2003).

O tratamento de infecções ou parasitas por meio da imersão dos organismos em banhos contendo a droga veterinária (DV) pode produzir níveis sistêmicos decorrentes da passagem do composto através da superfície branquial e pele, e por consequência acúmulo nos tecidos (Papich; Riviere, 2009).

A administração oral de medicamentos veterinários torna o tratamento de peixes adultos relativamente fácil e barato. Portanto, este método tornou-se a principal via para medicar peixes (Kelly, 2013). A maior vantagem da administração da DV via ração é a redução de efluentes contendo o composto com consequente redução da exposição indesejável da droga no ambiente e outras espécies de peixes (Park et al., 2012).

Em decorrência da geração de resíduos de DV em tecidos de peixes pela exposição dos organismos a estes compostos através da água ou através da ração medicada, a descrição de metodologias que estabeleçam parâmetros de acúmulo e depleção da DV dos tecidos é necessária. Esta necessidade se aplica a compostos permitidos pela legislação, assim como na pesquisa de moléculas com potencial de uso na produção aquícola. Estes procedimentos detalhados poderão ser adotados por laboratórios credenciados para auxiliar no registro da DV por órgãos governamentais de pesquisa e por laboratórios de pesquisa de empresas de comercialização da DV, de modo que os resultados contribuam para estimar o risco ao consumidor e também estimar uma quantidade segura de ingestão do produto alimentício (pescado ou outros produtos de origem aquícola). Além disso, também proporcionarão informações a serem adotadas pelos produtores acerca do período de carência para a depleção da DV dos tecidos dos peixes antes do abate, de modo a fornecer para a comercialização um produto alimentício com limites máximos permissíveis compatíveis com a legislação.

Os resultados também fornecem informações a respeito do risco do lançamento de efluentes contendo a DV, que poderiam atingir o entorno do sistema de produção, provocando o acúmulo na biota aquática com consequente efeito na cadeia trófica, ou risco da ingestão humana desse organismo.

A respeito das considerações acima, serão descritas, metodologias referentes à avaliação do grau de acúmulo e depuração de drogas veterinárias decorrentes da exposição de peixes pelas duas vias já citadas, ou seja, através da água e através da dieta.

A título de exemplificação, dados de exposição a dois antimicrobianos (florfenicol e sulfametazina) em *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-Nilo) serão descritos para uma melhor compreensão do

delineamento experimental e do algoritmo (passo a passo) no cálculo e interpretação dos parâmetros farmacocinéticos.

Na medida do possível, procurar-se-á reunir, simplificar e exemplificar procedimentos descritos nas literaturas nacional e internacional (Organisation for Economic Co-Operation and Development, 1981a, 1981b, 2012; Oliver; Niimi, 1985; Spacie; Hamelink, 1985; IBAMA, 1988), que juntamente com a experiência prática adquirida na realização de estudos de avaliação de risco de agroquímicos e antibióticos (Jonsson; Toledo, 1993; Nunes et al., 2018; Jonsson et al., 2019; Shiroma et al., 2021), foram os instrumentos orientadores que permitiram concluir as metodologias propostas.

Definições

Droga veterinária (DV): composto de natureza química, biológica ou mista destinado a prevenir, diagnosticar ou curar doenças dos animais, ou que contribua para a manutenção da higiene animal.

Bioconcentração/bioacumulação: aumento da concentração da DV no organismo vivo em relação à concentração da DV no meio em que se encontra. O termo bioconcentração é preferencialmente usado quando o acúmulo ocorre pela respiração devido à exposição na água, enquanto que o termo bioacumulação se refere a esse processo através da água e do alimento contendo a DV.

Fator de bioconcentração (FBC): é o valor numérico do quociente entre a concentração da DV no tecido do organismo e a concentração de DV na solução-teste, quando em estado de equilíbrio estacionário, expresso na unidade mL . g⁻¹.

Estado de equilíbrio estacionário: é a situação na qual a concentração da DV é constante em relação ao tempo de exposição, ou a taxa de variação da DV no organismo é zero.

Assimilação: é o processo de ingresso da DV no organismo.

Depuração: é o processo de eliminação da DV pelo organismo para um meio isento da concentração da DV após a transferência do organismo para água isenta da DV, ou após a interrupção da alimentação do organismo com uma ração medicada.

k_1 : é a constante de assimilação que define numericamente a taxa de acréscimo da concentração da DV no tecido do organismo quando este é exposto ao fármaco. É medida como o aumento na concentração da DV no organismo por unidade de concentração no meio, por unidade de tempo. Expressa nas unidades mL . g⁻¹ . h⁻¹; g . g⁻¹ . h⁻¹ ou h⁻¹.

k_2 : é a constante de depuração que define numericamente a taxa de decaimento da concentração da DV no tecido após a transferência do organismo para um meio isento do fármaco, expressa na unidade h⁻¹.

Limite máximo de resíduo (LMR): é a concentração máxima de resíduo da DV no organismo, ou no produto alimentício, que é oficialmente tolerada em decorrência da exposição dos peixes na água ou pela ração aplicada. O valor de LMR geralmente é expresso em mg kg⁻¹.

Ingestão diária aceitável (IDA): é o valor numérico em mg kg⁻¹ por peso corpóreo (mg kg⁻¹ p.c.), que expressa a quantidade aceitável da DV que um ser humano adulto pode consumir, com segurança, durante todos os dias.

Período de depleção (Pd): é o tempo mínimo necessário para garantir que o resíduo da DV no produto alimentício seja igual ou menor do que o LMR.

Avaliação da bioconcentração e do período de depleção de drogas veterinárias em peixes expostos através da água

Fundamento

O procedimento consiste na exposição de organismos (peixes) a uma determinada concentração da DV na água durante um período de tempo definido. A cada intervalo regular de tempo, durante esta fase de assimilação, amostras de água e de organismos são coletadas (Ibama, 1988). Após esta fase, os organismos são transferidos para água isenta da DV para avaliar a depuração. A partir dos dados de resíduos da DV no tecido e na água, é estimado o fator de bioconcentração (FBC) pelo quociente entre as taxas cinéticas de acúmulo e de eliminação (Spacie; Hamelink, 1985; Organisation for Economic Co-Operation and Development, 2012). O valor de concentração no tecido no estado de equilíbrio estacionário a uma dada concentração da DV na água, calculada através deste fator, pode ser comparado com o valor de LMR do produto alimentício. Essa concentração permite calcular a ingestão máxima da DV através do consumo do alimento (peixes) de modo que não se ultrapasse o valor da IDA.

Os dados da fase de depuração também permitem calcular um período de depleção dos resíduos da DV para que estes sejam diminuídos para o limite máximo permitido no produto alimentício, de acordo com a legislação vigente. Este período pós-tratamento é o tempo compreendido entre a interrupção do tratamento com a DV até a retirada dos peixes para o abate (Nunes et al., 2018).

Delineamento experimental em exposições através da água

Água de diluição

A água de boa qualidade deve ser adequada à manutenção dos organismos e não deve afetá-los durante a execução de estudo. A água deve ser desclorada com prévia aeração ou pela adição de tiosulfato de sódio. Neste último caso utilizam-se 7 mg deste composto para cada miligrama de cloro livre (Murty, 1986).

Ou então, pode ser aerada através de mini compressor, mangueira e pedra porosa, de modo a oferecer boas condições de sobrevivência e bem-estar aos organismos. Recomenda-se uma concentração de oxigênio dissolvido de no mínimo 60% da saturação. Periodicamente deve-se proceder às medidas de pH, dureza, amônia, condutividade, oxigênio dissolvido e temperatura (Ibama, 1988; Estados Unidos, 1996; Organisation for Economic Co-Operation and Development, 2012).

Solução-teste

A solução-teste deve ser preparada mediante a dissolução de um volume adequado de uma solução-estoque contendo a DV em um determinado volume água de diluição. Esta solução-estoque por sua vez é preparada pela adição e dissolução de uma massa apropriada da DV diretamente num dado volume de água de diluição. Na solução-teste serão alocados os organismos-teste e a concentração da DV escolhida será a que se utiliza no tratamento (Shiroma et al., 2021). Alternativamente pode

se utilizar 1/10 da concentração letal média (CL50-96h) da DV em questão (Jonsson et al., 2019; Venkateswarlu; Venkatrayulu, 2020).

Organismos-teste

Os organismos (peixes) a serem avaliados devem ser aclimatados às condições laboratoriais em que o teste será realizado pelo período de pelo menos 10 dias (Jonsson et al., 2002).

O lote dos peixes a serem utilizados deve ter um tamanho uniforme em que o maior organismo não deve ser 1,5 vezes maior que o menor peixe. Outro critério é que o peixe com menor peso não deva ser menor que 2/3 do peso do maior peixe (Organisation for Economic Co-Operation and Development, 1981a, 1981b, 2012).

A aprovação do estudo, por motivo de uso de animais experimentais, deverá ser outorgada previamente pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) da instituição envolvida no teste.

Densidade

Com relação à densidade utilizada durante o estudo, ou seja, a relação entre a biomassa dos organismos-teste e o volume da solução-teste, recomenda-se não ultrapassar 1 g por litro (Organisation for Economic Co-Operation and Development, 2012). Entretanto, a literatura relata sobre densidades superiores a esta (~2 g por litro) em estudos de avaliação de acúmulo de xenobióticos (Song et al., 2012; Shiroma et al. 2021). Na dependência do objetivo do estudo, como por exemplo, quando se deseja avaliar o período de depleção de um dado composto num sistema de produção, pode-se adotar a mesma densidade que a utilizada habitualmente no tratamento terapêutico.

Temperatura e período de exposição

A temperatura da água e o período em que o organismo-teste será exposto à DV serão compatíveis, respectivamente, com a espécie de organismo e com o tempo adotado no tratamento através da água (Organisation for Economic Co-Operation and Development 2012, Shiroma, 2021). Alternativamente, poderá se adotar como tempo de exposição (fase de assimilação) um período semelhante ao de depuração, conforme calculado no item Amostragem. (Organisation for Economic Co-Operation and Development, 1981a, 1981b, 2012).

Amostragem

Um número de pelo menos 40 organismos-teste será alocado em quatro recipientes (aquários ou tanques). Com relação a esses, deve-se tomar cuidado para evitar o uso de aquários ou tanques compostos por materiais que possam adsorver a DV ou lixiviar, e ter um efeito adverso nos peixes. Podem ser usados tanques retangulares ou cilíndricos feitos de material quimicamente inerte (preferencialmente vidro ou aço inox) e de capacidade adequada de acordo com a densidade a ser usada (Organisation for Economic Co-Operation and Development, 2012).

Durante a fase de assimilação da DV um peixe de cada recipiente deverá ser amostrado em períodos que seguem uma progressão geométrica, como por exemplo, em 3, 6, 12, 24, 48 e 100% do tempo total de exposição. Isso permite obter uma curva de assimilação da DV, que deve conter pelo menos cinco pontos, sendo que cada ponto corresponderá no mínimo a quatro réplicas (Organisation for

Economic Co-Operation and Development, 2012). Amostras de água também deverão ser coletadas desses recipientes, identificadas e armazenadas em freezer (- 20 °C) para análise de resíduos.

Terminado o período de exposição à DV, os organismos remanescentes deverão ser expostos à água isenta da DV e recirculada através de filtros externos contendo carvão ativo que funciona como adsorvente da DV.

Para fins de planejamento do experimento, o período de depuração de 99,99% do resíduo ($T_{99,99}$; em horas) pode ser estimado através da Equação 1 (Organisation for Economic Co-Operation and Development, 2012) :

$$T_{99,99} = - \frac{\text{Ln}(0,0001)}{k_{2\text{hip}}} = \frac{9,2}{k_{2\text{hip}}} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde $k_{2\text{hip}}$ é a constante de eliminação hipotética, que pode ser estimada com base na solubilidade da DV na água (S) em mg L^{-1} , conforme a Equação 2 (Organisation for Economic Co-Operation and Development, 1981b):

$$\log k_{2\text{hip}} = 0,43 \log S - 2,11 \quad (\text{Eq. 2})$$

A amostragem durante o período de depuração deverá ser realizada em no mínimo quatro ocasiões distribuídas numa progressão geométrica, como por exemplo, 3, 6, 12, 24, 48 e 100% do $T_{99,99}$, de modo a se obter uma curva de eliminação da DV contendo no mínimo cinco pontos. O primeiro ponto corresponde à 0 hora de depuração (última coleta da fase de assimilação). A cada ponto corresponderá a amostragem de pelo menos quatro (4) organismos-teste.

Simultaneamente à exposição à DV, deverão ser avaliados peixes não expostos à DV que servirão como controle. Entretanto, não sendo detectados níveis significativos da DV no início da fase de assimilação, a amostragem de dois a três peixes no final desta fase, e no final da fase de depuração, seria suficiente para servir como controle (Organisation for Economic Co-Operation and Development, 2012).

Os peixes coletados deverão ser eutanasiados pela imersão em solução de benzocaína a 65 mg L^{-1} , seguida de secção medular. Posteriormente, deve-se proceder à filetagem das seções musculares sendo as amostras de filé corretamente identificadas e armazenadas em freezer (-20°C) para posterior análise de resíduos da DV (Jonsson et al., 2019; Shiroma et al., 2021). O tempo máximo de estocagem em freezer será adotado conforme as recomendações do laboratório executor da análise de resíduos.

Os procedimentos de análises de resíduos não serão discutidos neste documento, por serem específicos para cada molécula e matriz que se pretende estudar.

A título de exemplificação, na Tabela 1 são apresentadas as condições experimentais decorrentes de um estudo com o antibiótico florfenicol em tilápias (Shiroma et al., 2021), cujos resultados estão nas Tabelas 3 e 4, e analisados em itens subsequentes.

Tabela 1. Condições experimentais de exposição na água de tilápia-do-nylo ao antibiótico Florfenicol para avaliação da bioconcentração e o período de depleção.

Organismo-teste	<i>Oreochromis niloticus</i>
Água de diluição	Rede de abastecimento declorinizada
Características físico-químicas da água de diluição	Temperatura = 26 ± 1 °C; pH = $7,2 \pm 0,2$; oxigênio dissolvido = $8,1 \pm 0,5$ mg L ⁻¹ ; condutividade = $0,09 \pm 0,01$ µS cm ⁻¹ ; amônia total = $0,31$ µg mL ⁻¹ ; dureza total = 3 dH (graus Deutsche Härte)
Fotoperíodo	16 horas luz/8 horas escuro
Período de aclimatação	14 dias
Alimentação	Diariamente com ração comercial isenta da DV na proporção de 1–2% do peso corpóreo
Droga veterinária	Florfenicol, contido em produto comercial (pó) na concentração de 30% (peso/peso)
Concentração nominal do princípio ativo na água	10 mg L ^{-1a}
Solubilidade em água (25 °C) do princípio ativo	1.320 mg L ⁻¹
Período total da fase de exposição	48 h ^a
Período da fase de depuração	120 h ^b
Comprimento médio dos peixes	$13 \pm 0,6$ cm
Peso médio dos peixes	37 ± 5 g
Densidade (número de peixes/volume útil do recipiente)	16 peixes / 300 L
Número de recipientes sob tratamento	05
Número de recipientes controle	05
Amostragem na fase de assimilação	1,5; 3; 6; 24 e 48 h
Amostragem na fase de depuração	1,5; 3; 6; 24, 48 e 120 h
Número de organismos por amostragem	05 (01 para cada recipiente)

^a Os valores de concentração-teste e período total de exposição foram adotados conforme uso de antibiótico no transporte de peixes (Sudarto et al., 2003).

^b O período $T_{99,99}$ estimado de acordo com as Equações (1) e (2) foi equivalente a 54,11h.

$$\text{Log } k_{2\text{hip}} = 0,43 \times \log 1.320,00 - 2,11 \quad \text{Log } k_{2\text{hip}} = 0,43 \times 3,12 - 2,11$$

$$\text{Log } k_{2\text{hip}} = 1,34 - 2,11 = -0,77 \quad k_{2\text{hip}} = 0,17 \text{ h}^{-1}$$

$$T_{99,99} = 9,2/k_{2\text{hip}} \quad T_{99,99} = 9,2/0,17 \quad T_{99,99} = 54,11 \text{ h}$$

Entretanto, neste estudo foram coletadas amostras adicionais até aproximadamente o dobro do valor de $T_{99,99}$ (120 horas), de modo a garantir a eliminação total do fármaco do tecido.

Avaliação do acúmulo e eliminação através da ingestão de uma ração medicada

A administração da DV através de alimento é o método mais comumente utilizado pelos produtores devido a sua maior praticidade e menor custo. Neste tipo de manejo, a determinação do tempo de carência antes do abate (período de depleção - Pd) torna-se um parâmetro de suma importância para a comercialização de um produto alimentício com nível de resíduo de acordo com a legislação vigente.

Como exemplo, na Tabela 2 está resumido o delineamento experimental de um estudo com o antibiótico sulfametazina, administrado em tilápias através da dieta (Nunes et al., 2018).

Previamente, os organismos foram alimentados com uma ração isenta da DV durante um período de aclimação. Durante o período de tratamento os peixes passaram a ser alimentados com a mesma ração contendo a DV numa determinada dose diária (dose terapêutica), expressa em quantidade do princípio ativo/peso do animal. Uma vez finalizado o período de tratamento, os peixes voltaram a ser alimentados com a ração sem conteúdo da DV. Nesta última fase foram feitas coletas periódicas de modo a obter uma relação inversamente proporcional entre os níveis de resíduos no tecido e o tempo (Paschoal et al., 2011).

O Pd e a influência da temperatura neste parâmetro são calculados conforme será exposto no item Cálculo do período de depleção (Pd). Associações entre os níveis de resíduos encontrados logo após o último dia de tratamento e o risco para o consumidor podem ser realizadas conforme apresentado no item Aplicação do FBC na avaliação de risco da ingestão de alimento contendo a DV, considerando o valor de IDA e estimativa de consumo de peixe.

Tabela 2. Condições experimentais de exposição de tilápia-do-nilo ao antibiótico sulfametazina através de uma ração medicada para avaliação do período de depleção (Nunes et al., 2018)

Organismo-teste	<i>Oreochromis niloticus</i>
Água de diluição	Rede de abastecimento declorinizada
Peso médio dos peixes	30 ± 5 g
Densidade (número de peixes/volume útil do recipiente)	18 peixes/200 L
Número de recipientes sob tratamento	06
Número de recipientes controle	01
Condições ambientais:	Temperatura: 26 ± 2 °C Fotoperíodo: 16 horas luz / 8 horas escuro Oxigênio dissolvido: 7,12 ± 0,33 (mg L ⁻¹) pH: 6,50 ± 0,22
Renovação da água	03 vezes por semana
Período de aclimação	10 dias
Alimentação durante o período de aclimação, assimilação e depuração	Ração comercial extrusada, administrada 02 vezes por dia, na proporção aproximada diária de 2% de peso corpóreo.
Droga veterinária	Sulfametazina (4-Amino N-(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl) benzenesulfonamide); pureza > 99%
Dose nominal diária	0,4 g / kg peso corpóreo
Concentração do princípio ativo na ração	24,3 mg /g
Solubilidade em água do princípio ativo	1.500 mg L ⁻¹ (29 °C; pH 7) https://go.drugbank.com/drugs/DB01582
Período total da fase de exposição com ração medicada	11 dias
Período total da fase de depuração com ração isenta da DV	15 dias
Amostragem na fase de depuração	6, 12, 24, 48, 72, 144, 168 e 360 h
Número de organismos por amostragem	10 (02 por recipiente)

Análise dos resultados da estimativa da bioconcentração e do período de depleção após a exposição a uma droga veterinária

A título de exemplo, é apresentado o tratamento de dados e obtenção de parâmetros cinéticos decorrente de um estudo com o antibiótico florfenicol, aplicado em tilápias (Shiroma et al., 2021) através da água, conforme delineamento experimental apresentado na Tabela 1.

Após a estocagem das amostras em freezer e a análise dos resíduos do antibiótico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), obteve-se os resultados apresentados nas Tabelas 3 e 4. Estes são relativos a cada período de amostragem dos peixes na fase de assimilação (acúmulo) e de eliminação (depuração), respectivamente.

Tabela 3. Concentração de florfenicol (C_{FF}) em filé de tilápias na fase de assimilação decorrente da exposição à concentração nominal de 10 mg L^{-1} durante 48 horas.

Tempo de exposição (h)	C_{FF} ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1,5	0,0436
1,5	0,0085
1,5	0,0693
1,5	0,0587
3	0,0240
3	0,0298
3	0,1459
3	0,0374
3	0,0608
6	0,0910
6	0,2114
6	0,0985
6	0,1543
6	0,2042
24	0,3803
24	0,3635
24	0,3327
24	0,2974
24	0,2937
48	0,5487
48	0,4865
48	0,9200
48	0,6763
48	0,5092

Tabela 4. Concentração de florfenicol (C_{FF}) em filé de tilápias durante a fase de eliminação da DV após a exposição à concentração nominal de 10 mg L⁻¹ durante 48 horas

Tempo (h)	C_{FF} ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Log C_{FF} ($\mu\text{g g}^{-1}$)
0	0,5487	-0,2607
0	0,4865	-0,3129
0	0,9200	-0,0362
0	0,6763	-0,1699
0	0,5092	-0,2931
1,5	0,3177	-0,4980
1,5	0,2681	-0,5717
1,5	0,2985	-0,5251
1,5	0,2228	-0,6522
1,5	0,2102	-0,6774
3	0,2771	-0,5574
3	0,2652	-0,5764
3	0,2765	-0,5584
3	0,1948	-0,7103
3	0,2395	-0,6208
6	0,1740	-0,7593
6	0,2601	-0,5848
6	0,2258	-0,6462
6	0,1876	-0,7268
6	0,2250	-0,6477
24	0,0199	-1,7010
24	0,0166	-1,7808
24	0,0006	-3,2344
24	0,0117	-1,9305
24	0,0087	-2,0607
48	0,0039	-2,4086
48	0,0042	-2,3770
48	0,0015	-2,8320
48	0,0032	-2,5003
48	0,0022	-2,6575
120	0,0023	-2,6316
120	0,0019	-2,7111
120	0,0022	-2,6665
120	0,0030	-2,5268
120	0,0021	-2,6708

Cálculo e aplicação das constantes cinéticas e do Fator de Bioconcentração

Para o cálculo do FBC foi utilizada a relação cinética, que descreve a taxa de assimilação e eliminação, descrito pela Equação 3 (Organisation for Economic Co-Operation and Development, 2012):

$$\begin{cases} \frac{dC_{FF}}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_{FF} \\ C_{FF}(0) = 0 \end{cases} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde: C_{FF} = concentração de florfenicol no músculo do peixe ($\mu\text{g g}^{-1}$)

C_W = concentração de florfenicol na água ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

k_1 = constante de assimilação (h^{-1})

k_2 = constante de depuração (h^{-1})

Quando o estado de equilíbrio é atingido, ou seja, quando não se observa um aumento da concentração no tecido do organismo em função do tempo de exposição tem-se na Equação 3

$\frac{dC_{FF}}{dt} = 0$, acarretando que $\frac{C_{FF}}{C_W} = \frac{k_1}{k_2}$. Consequentemente, o fator de bioconcentração (FBC) é estimado por

$$\text{FBC} = \frac{k_1}{k_2} = \frac{C_{FF}}{C_W} \quad (\text{Eq. 4})$$

O valor numérico do FBC pode ser estimado utilizando-se a Equação 4 supondo um estado de equilíbrio estacionário, ou seja, $\frac{dC_{FF}}{dt} = 0$, que também exprime uma relação entre a concentração da DV no tecido dos peixes em estado de equilíbrio estacionário e a concentração na água, C_W . O estado de equilíbrio estacionário pode ser verificado quando o FBC não muda significativamente ($p < 0,05$) de valores ao longo de um período equivalente (ou maior) a 16% do total do tempo de exposição do organismo a concentrações de DV (Stephen et al., 2010). Isto pode ser conferido por meio do teste t de Student, utilizando-se o aplicativo Excel do MS-Office.

Quando não é atingido o estado de equilíbrio estacionário, como no caso deste exemplo, o fator de bioconcentração (FBC) pode ser calculado de acordo com a Equação 5, ou seja, pelo quociente entre as taxas de assimilação e a taxa depuração. Assim, o FBC é dado por (Oliver; Niimi, 1985; Organisation for Economic Co-Operation and Development, 2012).

$$\text{FBC} = \frac{k_1}{k_2} \quad (\text{Eq. 5})$$

Estimativa da taxa de depuração k_2

Primeiramente, deve-se calcular a constante de eliminação k_2 , através da inclinação da reta dada pelo logaritmo (base 10) da concentração da DV no tecido " $\log C_{FF}$ " em função do tempo da eliminação (Spacie; Hamelink, 1985; Shiroma et al., 2021). Para isto, os valores da concentração da DV no

tecido são convertidos em logaritmo, observando-se que devem ser excluídos os valores inferiores ao limite de detecção do método, caso estejam presentes (Organisation for Economic Co-Operation and Development, 2012). Os gráficos, assim como a inclinação da reta, podem ser obtidos através do programa Excel nas funções “Inserir gráfico” e “Inserir função / INCLINACAO”. No exemplo deste estudo, os valores referentes a 24, 48 e 120 h, na fase de depuração, foram excluídos devido ao limite de detecção ser de $0,06 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tabela 4).

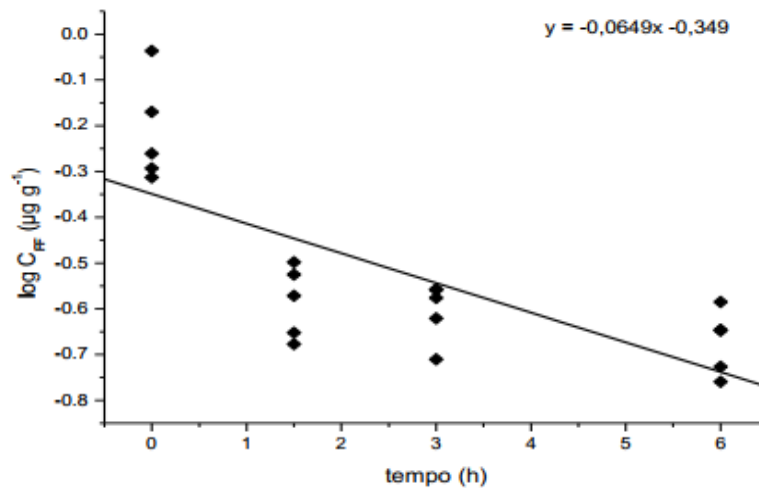


Figura 1. Linearização da curva de regressão referente à concentração de florfenicol em músculo de tilápia na fase de depuração em função do tempo (Shiroma, 2019)

Desta maneira, obtém-se uma reta (Figura 1), cuja inclinação é equivalente a $-0,0649$. Devido aos valores estarem em log (base 10), a inclinação deve ser multiplicada pelo fator $-2,303$ para se obter o valor de k_2 (Equação 6) (Shiroma et al., 2021).

$$k_2 = \text{INCLINAÇÃO} \cdot (-2,303) \quad (\text{Eq. 6})$$

$$k_2 = -0,0649 \cdot (-2,303)$$

$$k_2 = 0,149 \text{ h}^{-1}$$

O valor de k_2 permite também calcular o tempo de meia-vida biológica de florfenicol ($t_{1/2b}$) através da Equação 7, ou seja, o tempo em que há redução na concentração do composto no tecido do peixe em 50% do valor inicial. Isso permite fazer comparações a respeito do padrão de eliminação entre diferentes espécies ou entre diferentes DVs para uma espécie. Também permite estudar fatores bióticos e abióticos que interferem na depuração.

$$t_{1/2b} = 0,693/k_2 \quad (\text{Eq. 7})$$

$$t_{1/2b} = 0,693/0,149$$

$$t_{1/2b} = 4,65 \text{ h}$$

Cálculo de k_1 e BCF

Neste exemplo, a concentração nominal de florfenicol na água proposta para o estudo foi de 10 mg L⁻¹. Entretanto, a concentração real média determinada para o período de exposição foi de 11,72 mg L⁻¹, valor adotado para o cálculo de k_1 .

Quando a C_w é constante, a Equação 3 pode ser integrada resultando na Equação 8. A inclinação da reta referente a C_{FF} em função de $1-e^{-k_2t}$ é equivalente a " $k_1/k_2 C_w$ " (Equação 9).

$$C_{FF} = (k_1/k_2 C_w)(1-e^{-k_2t}) \quad (\text{Eq. 8})$$

$$\text{Inclinação} = k_1/k_2 C_w \quad (\text{Eq. 9})$$

Tendo-se calculado a k_2 , para a determinação do BCF constrói-se um gráfico das concentrações da DV no tecido (C_{FF}) durante a fase de assimilação em função expressão $(1-e^{-k_2t})$ (Oliver; Niimi, 1985). Nesta, "e" é a base do logaritmo neperiano (2,718), enquanto "t" é o tempo correspondente a cada valor da C_{FF} nesse período de assimilação. Os valores são apresentados na Tabela 5 tendo sido excluídos os valores inferiores ao limite de detecção (0,06 µg g⁻¹)

Neste exemplo, o gráfico gerado (Figura 2) relaciona a concentração do florfenicol presente em músculo com a expressão $(1-e^{-k_2t})$, calculada nos tempos (t) 1,5; 3; 6; 24 e 48 h da fase de assimilação.

Tabela 5. Valores de concentração de florfenicol em músculo de tilápia em função dos valores de $(1-e^{-k_2t})$ referentes a cada tempo de amostragem durante a fase de assimilação.

$1-e^{-k_2t}$	C_{FF} (µg g ⁻¹)
0,201	0,069
0,201	0,059
0,361	0,146
0,361	0,061
0,592	0,091
0,592	0,211
0,592	0,098
0,592	0,154
0,592	0,204
0,972	0,380
0,972	0,364
0,972	0,333
0,972	0,297
0,972	0,294
0,999	0,549
0,999	0,487
0,999	0,920
0,999	0,676
0,999	0,509

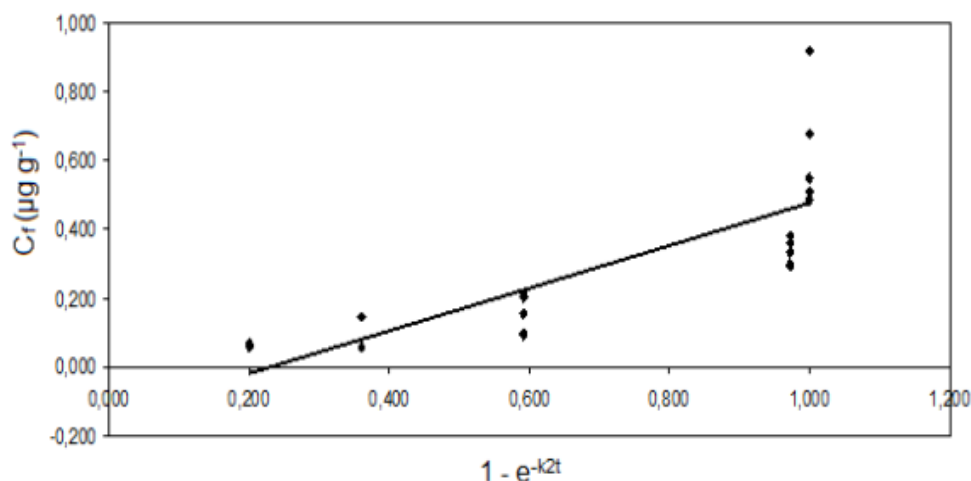


Figura 2. Relação entre os valores de concentração de florfenicol em músculo de *O. niloticus* na fase de exposição à DV e valores de $(1 - e^{-k_2 t})$ nos diferentes períodos (t) desta fase (Shiroma, 2019)

A regressão linear simples dos dados da Figura 2 gera a equação $y = 0,619x - 0,146$, cuja inclinação é equivalente a 0,619, calculada pelo programa Excel (Inserir função/INCLINACAO). Portanto, substituindo na Equação 9 e na Equação 5:

$$\text{INCLINACAO} = (k_1/k_2) C_w$$

$$0,619 = (k_1/0,149) \times 11,72$$

$$k_1 = (0,619 \times 0,149) / 11,72$$

$$k_1 = 0,0077 \text{ h}^{-1}$$

$$\text{BCF} = k_1/k_2 = 0,0077 / 0,149$$

$$\text{BCF} = 0,052 \text{ mL. g}^{-1}$$

Portanto, na situação de estado de equilíbrio estacionário, a concentração de antibiótico no filé de peixe seria equivalente a 0,052 vezes a concentração na água. Nesta situação e aplicando a Equação 4, o nível de resíduo em tecido (C_{FF}) seria equivalente a $0,62 \mu\text{g g}^{-1}$ ($C_{FF} = 0,052 \times 11,72 = 0,62$).

Aplicação do FBC na avaliação de risco da ingestão de alimento contendo a DV

Avaliar o FBC é relevante para confrontar os dados de acúmulo de um composto em determinado organismo com os valores de LMR e de IDA propostos por agências reguladoras. Inferências podem ser realizadas atribuindo concentrações hipotéticas da DV na água de modo a se estimar a quantidade do produto alimentício a ser consumido (Jonsson et al., 2019).

Por exemplo, tendo-se avaliado para o florfenicol um FBC equivalente a 0,052 e permanecendo as tilápias numa C_w hipotética de $58,60 \mu\text{g mL}^{-1}$ (cinco vezes superior ao valor experimental descrito de $11,72 \text{ mg L}^{-1}$), estima-se uma concentração média em tecido no estado de equilíbrio equivalente a $3,10 \mu\text{g g}^{-1}$. Assim, de acordo com a Equação 5:

$$FBC = C_{FF} / C_w$$

$$C_{FF} = FBC C_w$$

$$C_{FF} = 0,052 \times 58,60 = 3,05 \mu\text{g g}^{-1}$$

Este valor de resíduo de florfenicol ultrapassaria o valor de LMR proposto para o antibiótico, que é equivalente a $1 \mu\text{g g}^{-1}$ de filé (European Commission, 2010; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2018).

Segundo a Food and Drug Administration (Estados Unidos, 2019), a IDA do florfenicol é de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo (PC) por dia. Portanto, segundo a Equação 10 a ingestão máxima permitida para um indivíduo (IMP) de 70 kg de peso corpóreo é equivalente a $700 \mu\text{g}$ florfenicol.

$$IMP = IDA PC \quad (\text{Eq. 10})$$

$$IMP = 10 \times 70 = 700 \mu\text{g}$$

Esta quantia do antibiótico poderia ser consumida pelo aporte diário de uma quantidade de peixe (Q_p), equivalente a aproximadamente 230 g de filé, segundo a Equação 11:

$$Q_p = IMP / C_{FF} \quad (\text{Eq. 11})$$

$$Q_p = 700/3,05$$

$$Q_p = 229,51 \text{ g}$$

Segundo dados da FAO (FAO, 2022), o consumo médio de filé de peixe por ano é de aproximadamente 20 kg, ou seja, aproximadamente 55 g ao dia. Esta quantidade de filé de peixe é bem inferior à necessária para se atingir as $700 \mu\text{g}$ de florfenicol pelo consumo aproximado de 230 gramas de filé de peixe. Entretanto, devem ser observadas as diferenças regionais relacionadas à quantidade ingerida de filé de peixe contendo a DV.

Cálculo do período de depleção (Pd)

Calcula-se o tempo necessário para a eliminação de florfenicol até que a concentração do antibiótico no músculo for inferior ao LMR ($1 \mu\text{g g}^{-1}$) estabelecido pela legislação (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2018).

Cálculo através da regressão linear simples utilizando o programa Excel

Para cada período de amostragem, os dados de resíduos referentes à fase de eliminação (Tabela 4) são transformados em logaritmo neperiano (Ln) (Tabela 6). Neste exemplo houve uma transformação dos valores de $\mu\text{g g}^{-1}$ para ng g^{-1} , de modo a não se obter valores negativos de Ln (Nunes et al., 2018; Shiroma et al., 2021).

Tabela 6. Logaritmo neperiano (Ln) da concentração de florfenicol em função do tempo de depuração por tilápias expostas previamente à concentração nominal de 10 mg L⁻¹ durante 48 horas

Tempo (h)	C _{FF} (ug g ⁻¹)	C _{FF} (ng g ⁻¹)	Ln C _{FF} (ng g ⁻¹)
0	0,5487	548,665	6,307488
0	0,4865	486,5484	6,187336
0	0,9200	919,9804	6,824352
0	0,6763	676,3132	6,516656
0	0,5092	509,2292	6,232898
1,5	0,3177	317,6573	5,760973
1,5	0,2681	268,0783	5,591279
1,5	0,2985	298,4739	5,698683
1,5	0,2228	222,7592	5,406091
1,5	0,2102	210,1756	5,347943
3	0,2771	277,0618	5,624241
3	0,2652	265,2077	5,580513
3	0,2765	276,4654	5,622086
3	0,1948	194,8379	5,272168
3	0,2395	239,4636	5,478401
6	0,1740	174,0405	5,159288
6	0,2601	260,1059	5,561089
6	0,2258	225,8239	5,419756
6	0,1876	187,5677	5,23414
6	0,2250	225,0453	5,416302

Para fins de estimativa de um maior risco, o Pd é calculado a partir do limite superior do intervalo de tolerância 99% com nível de certeza de 95% (Paschoal et al. 2011; Nunes et al., 2018). Este limite refere-se ao valor superior de um intervalo estatístico, que fornece limites dentro do qual uma certa proporção da população (99%) cai com um dado nível de confiança (95%) (Young, 2010).

Aplicam-se, portanto, a Equação 12 e a Equação 13, resultantes da equação da reta, e descritas de acordo com protocolo para a determinação de períodos de carência adotados pela União Europeia (European Medicines Agency, 2016).

$$y = b x + a + K Syx \quad (\text{Eq. 12})$$

$$x = [y - a - (K Syx)] / b \quad (\text{Eq. 13})$$

Sendo “x” referente ao tempo (h), o período de depleção (Pd) para se atingir o LMR pode ser calculado pela Equação 14:

$$Pd = [y - a - (K Syx)] / b \quad (\text{Eq. 14})$$

onde:

y: é o Ln do valor de LMR (1000 ng g⁻¹ para florfenicol). Neste exemplo é equivalente a 6,9077, calculados pela função Ln do programa Excel.

b: é a inclinação da reta de regressão. No exemplo é equivalente a -0,1493, calculada pela função INCLINAÇÃO do programa Excel, inserindo os valores de Ln C_{FF} (ng g⁻¹) como variável “y” e valores de Tempo (h) de eliminação como variável “x”.

a: é a intersecção da reta de regressão. No exemplo é equivalente a 6,1042, calculados pela função INTERSECÇÃO do programa Excel, inserindo os valores de $\ln C_{FF}$ (ng g⁻¹) como variável “y” e valores de Tempo (h) como variável “x”.

Sxy: é o desvio padrão da regressão (Sxy). No exemplo é equivalente a 0,3158, calculado pela função EPADYX do programa Excel, inserindo os valores de $\ln C_{FF}$ (ng g⁻¹) como variável “y” e valores de Tempo (h) como variável “x”.

K: é um fator para graus de liberdade referente a 99% da população com 95% de nível de certeza. No exemplo é equivalente a 3,370. Este valor é extraído do Anexo 1 (Lieberman, 1957; Owen, 1963) para $\gamma = 0,95$; $P = 0,99000$ ($\alpha = 0,01$) e $n = 18$ (20 observações -2).

Substituindo-se os valores na Equação 14, obtém-se:

$$Pd = [6,9077 - 6,1042 - (3,370 \times 0,3158)] / -0,1493$$

$$Pd = 1,74 \text{ h}$$

Portanto, 1,74 horas é o período necessário para ocorrer o decaimento da concentração de florfenicol em tilápias até o LMR após a exposição dos peixes à concentração nominal de 10 mg L⁻¹ durante um período de 48 horas.

Cálculo através do uso de programa computacional promulgado pela União Europeia

Utiliza-se o programa “Withdrawal Time Calculation for Milk - WTM14” da “European Medicine Agency”, disponível em <https://www.ema.europa.eu/en/determination-withdrawal-periods-milk>

Com a inserção dos dados de concentração do resíduo durante a fase de depuração, assim como os referentes a cada tempo de amostragem durante esta fase, o programa processa a curva de regressão linear (Figura 3), além da curva de limite de tolerância estatístico 99% com 95% de certeza.

A partir da curva deste limite de tolerância e do valor do LMR solicitado pelo programa, o Pd é calculado.

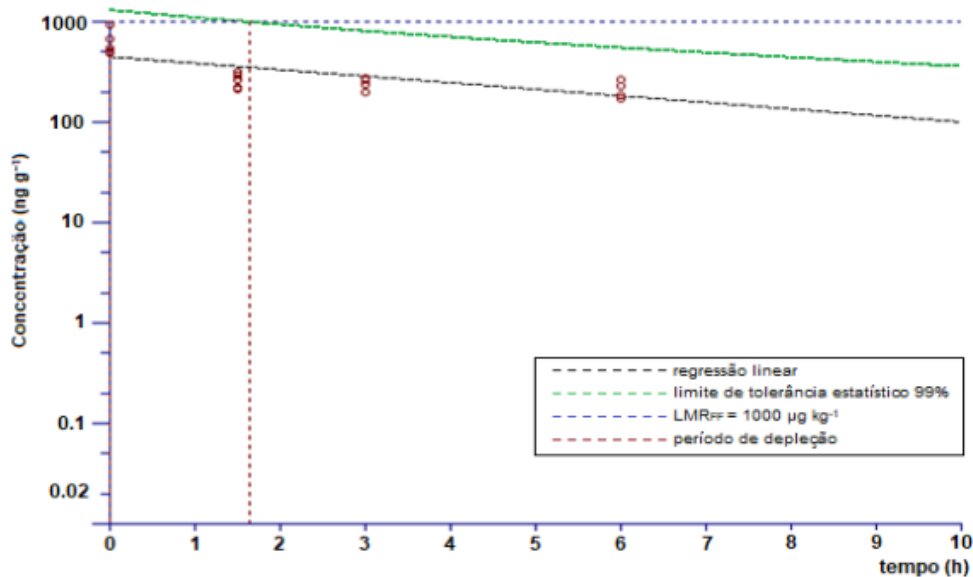


Figura 3. Concentração do florfenicol em músculo de *O. niloticus* no tempo em que o limite de tolerância 99% (superior unicaudal, 95% de confiança) é inferior ao LMR ($1 \mu\text{g g}^{-1}$), após a exposição ao antibiótico na água na concentração nominal de 10 mg L^{-1} por 48 h (Shiroma et al., 2021)

Após a exposição à concentração nominal de 10 mg L^{-1} durante 48 h, o período de depleção do florfenicol, calculado pelo programa de modo a que os resíduos diminuam ao LMR, é de 1,8 horas, valor muito próximo ao calculado no item anterior.

Correção do período de depleção de acordo com a temperatura

O Pd pode ser convertido no fator “°C-horas” de modo a considerar o perfil farmacocinético do antibiótico. Este é alterado pela influência da temperatura da água no metabolismo do peixe de uma forma diretamente proporcional. Portanto, o decréscimo da temperatura da água leva a uma diminuição da taxa metabólica que acarreta um tempo maior para a depleção dos resíduos. Assim, multiplicando-se o Pd pela média da temperatura da água durante a fase de depuração (°C), obtém-se o fator de correção “graus-tempo”, expresso na Equação 15 pelo fator °C-horas (Nunes et al., 2018; Shiroma et al., 2021).

$$\text{°C-horas} = \text{°C} \times \text{Pd} \quad (\text{Eq. 15})$$

Assim, o Pd modificado por uma dada temperatura (Pd_{mt}) constitui uma estimativa decorrente de uma outra situação de eliminação da DV, podendo ser calculada através da Equação 16:

$$\text{Pd}_{\text{mt}} = \text{°C-horas} / \text{°Cm}, \quad (\text{Eq. 16})$$

Onde °Cm é uma dada temperatura média modificada, em que ocorreria a fase de depuração.

No exemplo, para a temperatura de experimentação de 26 °C e Pd, equivalente a 1,74 h, o valor calculado do fator foi $45,24 \text{ °C-horas}$ quando substituímos na Equação 15:

$$\text{°C-horas} = 26 \times 1,74$$

$$\text{°C-horas} = 45,24$$

Assim, o valor do fator °C - horas, é aplicado na Equação 16, considerando-se que se o peixe estivesse em uma temperatura diferente de 26 °C (por exemplo, 20 °C; $C_m = 20$), o tempo necessário para se atingir o LMR seria de 2,26 h.

$$Pd_{mt} = 45,24 / 20$$

$$Pd_{mt} = 2,26 \text{ h}$$

Ou seja, comparando-se a condição de temperatura a 26 °C (condição de ensaio realizado) com uma situação hipotética de eliminação do florfenicol estabelecida em 20 °C, observa-se que as tilápias precisariam de um tempo maior para depurar os resíduos quando se situam num meio com menor temperatura. Este tempo seria de 2,26 horas, comparativamente às 1,74 horas na depuração em 26 °C.

Considerações finais

As metodologias referentes à avaliação do grau de acúmulo e depuração de drogas DVs, decorrentes da exposição de peixes a estes fármacos, poderão ser adotadas por laboratórios credenciados com o intuito da geração de dados para o registro de moléculas a serem comercializadas. Também poderão ser adotadas por órgãos de pesquisa e empresas de comercialização de DVs, cujos laboratórios de pesquisa estudem moléculas com uso promissor na aquicultura e gerem resultados que contribuam para estimar o risco ao consumidor.

Os produtores poderão se beneficiar com os resultados gerados por estas metodologias de modo que possam adotar um período de carência apropriado relacionado à depleção da DV dos tecidos antes do abate.

Os resultados também fornecem informações a respeito do risco do lançamento de efluentes contendo a DV, que poderiam atingir o entorno do sistema de produção provocando o acúmulo na biota aquática com conseqüente efeito na cadeia trófica, ou risco da ingestão humana desse organismo que foi exposto ao xenobiótico.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos patrocinadores do projeto BRS Aqua (Banco Nacional para o Desenvolvimento Econômico e Social - BNDES), sub-processo número 16.2.0225.1.

Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal**. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2018. 135 p. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5545276/Medicamentos+Veterin%C3%A1rios+-+Documento+base_discussao_28_DEZ_2018.pdf/b061f443-b558-4545-88c9-9246b184e23b?version=1.0. Acesso em: 9 maio 2022.
- ALY, S. M.; NOUH, W. G.; SALEM-BEKHIT, M. M. Bacteriological and histopathological studies on Enterobacteriaceae in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 7, p. 94-104, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA. **Anuário Brasileiro da Piscicultura: Peixe-BR 2022**. São Paulo, 2022. 153 p. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario2022/>. Acesso em: 5 dez. 2022.
- BORGHESI, R.; HISANO, H.; SUCASAS, L. F. DE A.; LIMA, L. K. F. de; OETTERER, M. **Influência da nutrição sobre a qualidade do pescado: especial referência aos ácidos graxos**. Corumbá: Embrapa Pantanal; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013. 21 p. (Embrapa Pantanal. Documentos, 124; Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 121). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/981590>. Acesso em: 5 dez. 2022.
- CARDOSO, L. D. **Efeito da ivermectina e do triclorfon em banho terapêutico para acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*, Lichtenstein, 1823) parasitados por *Clinostomum complanatum***. 2017. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacases.
- COMPÊNDIO de produtos veterinários SINDAM. 2016. São Paulo: MedVet Livros, 1227 p.
- ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. **Ecological effects test guidelines: OPPTS 850.1730, Fish BCF**. Washington, DC, 1996. 23 p.
- ESTADOS UNIDOS. Food and Drug Administration. **CFR - Code of Regulations Title 21: animal drugs, feeds, and related products: florfenicol**. 2019. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=556.283>. Acesso em: 9 maio 2022.
- EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation n° 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Union**, L 15/1. 2010. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32010R0037>. Acesso em: 9 maio 2022.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Guideline on approach towards harmonisation of withdrawal periods**. London: Committee for Medicinal Products for Veterinary Use, 2016. 37 p. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-approach-towards-harmonisation-withdrawal-periods_en.pdf. Acesso em: 9 maio 2022.
- FAO. **FAOSTAT**. 2012. Disponível em: <https://www.feedipedia.org/node/14675>. Acesso em: 10 out. 2022.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022: towards blue transformation**. Rome, 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cc0461en/cc0461en.pdf>. Acesso em: 5 dez. 2022.
- FIGUEIREDO, H. C. P. Antibióticos na aqüicultura. **Panorama da Aqüicultura**, 2008. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/sanidade-aquicola-antibioticos-na-aquicultura/>. Acesso em: 9 maio 2022.
- GOZI, K. S. **Perfil de resistência à antimicrobianos de *Aeromonas sp.* e *Streptococcus sp.* isolados de tilápia-do-Nilo e detecção dos genes envolvidos na resistência à tetraciclina**. 2016. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal.
- IBAMA. **Manual de testes para a avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Brasília, DF, 1988. 351 p.
- JONSSON, C. M.; FERRACINI, V. L.; PARAIBA, L. C.; RANGEL, M.; AGUIAR, S. R. Alterações bioquímicas e acúmulo em pacus (*Metynnis argenteus*) expostos ao paclobutrazol. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 441-446, 2002.
- JONSSON, C. M.; MOURA, M. A. M.; FERRACINI, V. L.; PARAÍBA, L. C.; ASSALIN, M. R.; QUEIROZ, S. C. N. Bioconcentrations of herbicides used in sugarcane crops in tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the risk for human consumption. **Heliyon**, v. 5, n. 8, e02237, 2019.
- JONSSON, C. M.; TOLEDO, M. C. F. Bioaccumulation and elimination of endosulfan in the fish yellow tetra (*Hyphessobrycon bifasciatus*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, p. 572-577, 1993.
- KELLY, A. M. **Medicated feed for food fish**. Stoneville: Southern Regional Aquaculture Center, 2013. 6 p. (SRAC Publication, 473). Disponível em: http://aquaculture.ca.uky.edu/sites/aquaculture.ca.uky.edu/files/srac_0473_medicated_feed_for_food_fish.pdf Acesso em: 9 maio 2022.

LIEBERMAN, G. J. **Tables for one-sided statistical tolerance limits**. California: Standard University of California, 1957. 24 p. (Technical Report, 34). Disponível em: <https://statistics.stanford.edu/sites/g/files/sbiybj6031/f/LIE%20ONR%2034.pdf>. Acesso em: 9 maio 2022.

MADUENHO, L. P.; MARTINEZ, C. B. R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C**, v. 148, n. 3, p. 265-272, 2008.

MBAWUIKE, B.; KASSIM, O. I.; KOLAWOLE-DANIELS, A.; ANJONU, N.; ADEJUMOBI, O.; UKAONU S. Handling and packaging of ornamental fishes for successful transportation. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 5, n. 5, p. 263-265, 2017.

MURTY, A. S. **Toxicity of pesticides to fish**. Boca Raton, 1986. v. 1.

NAÇÕES UNIDAS. **United Nations, World Population Prospects 2019**. 2019. Disponível em: <https://population.un.org/wpp/Graphs/Probabilistic/POP/TOT/76>. Acesso em: 9 maio 2022.

NUNES, K. S. D.; VALLIM, J. H.; ASSALIN, M. R.; QUEIROZ, S. C. N.; PARAIBA, L. C.; JONSSON, C. M.; REYES, F. G. R. Depletion study, withdrawal period calculation and bioaccumulation of sulfamethazine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) treated with medicated feed. **Chemosphere**, v. 197, p. 89-95, 2018.

OLIVER, B. G.; NIIMI, A. J. Bioconcentration factors of some halogenated organics for rainbow trout: limitations in their use for prediction of environmental residues. **Environmental Science & Technology**, v. 19, n. 9, p. 842-849, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1021/es00139a013>.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals: bioaccumulation: test for the degree of bioconcentration in fish: proposal for updating guideline 305**. Paris, 1981a. 24 p.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals: bioaccumulation: flow-through fish test: proc. 305 E**. Paris, 1981b. 24 p.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals: bioaccumulation in fish: aqueous and dietary exposure. Proc. 305**. Paris, 2012. 72 p. (Test n. 305).

OWEN, D. B. **Factors for one-sided tolerance limits and variables sampling plans, SCR-607**. Washington, DC.: Sandia Corporation, 1963. 412 p. Disponível em: <https://www.nrc.gov/docs/ML1403/ML14031A495.pdf>. Acesso em: 9 maio 2022.

PAPICH, M. G.; RIVIERE, J. E. Fluoroquinolone antimicrobial drugs. In: RIVIERE, J. E.; PAPICH, M. G.; ADAMS, H. R. (ed.) **Veterinary pharmacology and therapeutics**. 9th ed. Ames: Willey-Blackwell, 2009. p. 983-1012.

PARK, Y. H.; HWANG, S. Y.; HONG, M. K.; KWON, K. H. Use of antimicrobial agents in aquaculture. **Revue Scientifique et Technique**, v. 31, n. 1, 189-197, 2012.

PASCHOAL, J. A. R.; BICUDO, A. J. A.; CYRINO, J. E. P.; REYES, F. G. R. Depletion study and estimation of the withdrawal period for oxytetracycline in tilapia cultured in Brazil. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, n. 1, p. 90-96, 2011.

SHIROMA, L. S. **Desenvolvimento e validação de método para determinação de florfenicol e seu metabólito em tilápia por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial: aplicação em ensaios de bioconcentração**. 2019 108 f. Dissertação (Mestrado em Química, Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SHIROMA, L. S.; BOTTOLI, C. B. G.; JONSSON, C. M.; QUEIROZ, S. C. N. de Exposure of tilápia (*Oreochromis niloticus*) to the antibiotic florfenicol in water: determination of the bioconcentration factor and the withdrawal period. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 28, n. 29, p. 39026-39034, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13327-5>.

SILVA, S. A.; BONEMANN, D. H.; SILVA, J. S. da; TIMM, J. G.; RIBEIRO, A. S.; VIEIRA, M. A. Determinação de metais em peixes e camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) do estuário da Lagoa dos Patos (Pelotas-RS, Brasil) por MIP OES. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, e2018049, 2019.

SONG, Y.; SALBU, B.; HEIER, L. S.; TEIEN, H.-C.; LIND, O.-C.; OUGHTON, D.; PETERSEN, K.; ROSSELAND, B. O.; SKIPPERUD, L.; TOLLEFSEN, K. E. Early stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to environmentally relevant concentrations of uranium. **Aquatic Toxicology**, v. 112-113, p. 62-71, 2012.

SPACIE, A.; HAMELINK, J. L. Bioaccumulation. In: Rand, G.M.; Petrocelli, S.R. (Eds.). **Fundamentals of aquatic toxicology**. New York: Hemisphere, 1985. p. 495-525, 1985.

STEPHEN, C. E.; MOUNT, D. I.; HANSEN, D. J.; GENTILE, J. R.; CHAPMAN, G. A.; BRUNGS, W. A. **Guidelines for deriving numerical national water quality criteria for the protection of aquatic organisms and their uses: PB85-227049**. Duluth: USEPA, 2010. p. 26. 2010. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-02/documents/guidelines-water-quality-criteria.pdf>. Acesso em: 9 maio 2022.

SUDARTO, S. J.; DAY, D.; SLEMBROUCK, J.; POUYAUD, L. *Pangasius djambal* transportation, Chapter II. In: SLEMBROUCK, J.; KOMARUDIN, O.; MAKSUR; LEGENDRE, M. (ed.). **Technical manual for artificial propagation of the Indonesian catfish, *Pangasius djambal***. Jakarta: Institut de Recherche pour le Developpement, 2003. p.15-26.

VENKATESWARLU, V.; VENKATRAYULU, C. Bioaccumulation of heavy metal lead (Pb) in different tissues of brackish water fish *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758). **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 8, p. 1-5, 2020.

YOUNG, S. Book reviews: statistical tolerance regions: theory, applications, and computation. **Technometrics**, v. 52, n. 1, p. 143-144, 2010.

Anexo 1. Tabela de fatores de tolerância k para uma distribuição normal unilateral referente a uma proporção P de uma população (nível de certeza de 95%, $\gamma=0,95$). Extraído de Owen (1963) e Lieberman (1957).

n	P							
	.75000	.90000	.95000	.97500	.99000	.99900	.99990	.99999
2	11.763	20.581	26.260	31.257	37.094	49.276	59.304	68.010
3	3.806	6.155	7.656	8.986	10.553	13.857	16.598	18.986
4	2.618	4.162	5.144	6.015	7.042	9.214	11.019	12.593
5	2.150	3.407	4.203	4.909	5.741	7.502	8.966	10.243
6	1.895	3.006	3.708	4.329	5.062	6.612	7.901	9.025
7	1.732	2.755	3.399	3.970	4.642	6.063	7.244	8.275
8	1.618	2.582	3.187	3.723	4.354	5.688	6.796	7.763
9	1.532	2.454	3.031	3.542	4.143	5.413	6.469	7.390
10	1.465	2.355	2.911	3.402	3.981	5.203	6.219	7.105
11	1.411	2.275	2.815	3.292	3.852	5.036	6.020	6.878
12	1.366	2.210	2.736	3.201	3.747	4.900	5.858	6.694
13	1.328	2.155	2.671	3.125	3.659	4.787	5.723	6.540
14	1.296	2.109	2.614	3.060	3.585	4.690	5.609	6.409
15	1.268	2.068	2.566	3.005	3.520	4.607	5.510	6.297
16	1.243	2.033	2.524	2.956	3.464	4.535	5.424	6.199
17	1.220	2.002	2.486	2.913	3.414	4.471	5.348	6.113
18	1.201	1.974	2.453	2.875	3.370	4.415	5.281	6.037
19	1.183	1.949	2.423	2.841	3.331	4.364	5.221	5.968
20	1.166	1.926	2.396	2.810	3.295	4.318	5.167	5.906
21	1.152	1.905	2.371	2.781	3.263	4.277	5.118	5.850
22	1.138	1.886	2.349	2.756	3.233	4.239	5.073	5.799
23	1.125	1.869	2.328	2.732	3.206	4.204	5.031	5.752
24	1.114	1.853	2.309	2.710	3.181	4.172	4.994	5.709
25	1.103	1.838	2.292	2.690	3.158	4.142	4.959	5.670
26	1.093	1.824	2.275	2.672	3.136	4.115	4.926	5.633
27	1.083	1.811	2.260	2.654	3.116	4.089	4.896	5.598
28	1.075	1.799	2.246	2.638	3.098	4.066	4.868	5.566
29	1.066	1.788	2.232	2.623	3.080	4.043	4.841	5.536
30	1.058	1.777	2.220	2.608	3.064	4.022	4.816	5.508
31	1.051	1.767	2.208	2.595	3.048	4.002	4.793	5.481
32	1.044	1.758	2.197	2.582	3.034	3.984	4.771	5.456
33	1.037	1.749	2.186	2.570	3.020	3.966	4.750	5.433
34	1.031	1.740	2.176	2.559	3.007	3.950	4.730	5.410
35	1.025	1.732	2.167	2.548	2.995	3.934	4.712	5.389
36	1.019	1.725	2.158	2.538	2.983	3.919	4.694	5.369
37	1.014	1.717	2.149	2.528	2.972	3.904	4.677	5.350
38	1.009	1.710	2.141	2.518	2.961	3.891	4.661	5.332
39	1.004	1.704	2.133	2.510	2.951	3.878	4.646	5.314
40	.999	1.697	2.125	2.501	2.941	3.865	4.631	5.298
41	.994	1.691	2.118	2.493	2.932	3.854	4.617	5.282
42	.990	1.685	2.111	2.485	2.923	3.842	4.603	5.266
43	.986	1.680	2.105	2.478	2.914	3.831	4.591	5.252
44	.982	1.674	2.098	2.470	2.906	3.821	4.578	5.238
45	.978	1.669	2.092	2.463	2.898	3.811	4.566	5.224

Embrapa

Meio Ambiente

**MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA**

GOVERNO FEDERAL

UNIÃO E RECONSTRUÇÃO