



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FABÍOLA MALAGA BARRETO

**VEÍCULOS PARA RECOBRIMENTO DE RAÇÃO MEDICADA PARA  
PEIXES: IMPACTOS NA LIBERAÇÃO DO FLORFENICOL E  
DIGESTIBILIDADE APARENTE DA RAÇÃO MEDICADA EM TILÁPIA-DO-  
NILO (*Oreochromis niloticus*).**

**BINDING AGENTS FOR COATING OF MEDICATED FISH FEED: IMPACTS  
ON FLORFENICOL RELEASE AND APPARENT DIGESTIBILITY OF THE  
FEED IN NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*).**

CAMPINAS

2018

FABÍOLA MALAGA BARRETO

**VEÍCULOS PARA RECOBRIMENTO DE RAÇÃO MEDICADA PARA  
PEIXES: IMPACTOS NA LIBERAÇÃO DO FLORFENICOL E  
DIGESTIBILIDADE APARENTE DA RAÇÃO MEDICADA EM TILÁPIA-DO-  
NILO (*Oreochromis niloticus*).**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos.

Thesis presented to the Faculty of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor, in Food Science

Orientador: PROF. DR. FELIX GUILLERMO REYES REYES

Co-orientador: HAMILTON HISANO

Este exemplar corresponde à versão final defendida pela aluna Fabíola Málaga Barreto e orientada pelo Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 23038.002416/2015-25

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

B275v Barreto, Fabíola Malaga, 1983-  
Veículos para recobrimento de ração medicada para peixes : impactos na liberação do florfenicol e digestibilidade aparente da ração medicada em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Fabíola Malaga Barreto. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

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

1. Ração medicada. 2. Florfenicol. 3. Lixiviação. 4. Tilápia do Nilo. 5. Digestibilidade. I. Reyes, Felix Guillermo Reyes. II. Hisano, Hamilton. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Binding agents for coating on medicated fish feed : impacts on florfenicol release and apparent digestibility of the feed in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

**Palavras-chave em inglês:**

Medicated feed

Florfenicol

Leaching

Nile tilapia

Digestibility

**Área de concentração:** Ciência de Alimentos

**Titulação:** Doutora em Ciência de Alimentos

**Banca examinadora:**

Felix Guillermo Reyes Reyes [Orientador]

Claudio Martin Jonsson

Eduardo Gomes Sanches

Marcia Mayumi Ishikawa

Maria Jose Ranzani de Paiva

**Data de defesa:** 11-06-2018

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

**Comissão examinadora**

---

**Felix Guillermo Reyes Reyes (Orientador)**  
Faculdade de Engenharia de Alimentos

---

**Claudio Martin Jonsson (Membro Titular)**  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Meio Ambiente

---

**Eduardo Gomes Sanches (Membro Titular)**  
Instituto de Pesca

---

**Marcia Mayumi Ishikawa (Membro Titular)**  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Meio Ambiente

---

**Maria Jose Tavares Ranzani de Paiva (Membro Titular)**  
Instituto de Pesca

---

A ata de Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico este trabalho a minha família, minha fortaleza.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes pela oportunidade, pela amizade ao longo desses quatro anos e pelos conhecimentos repassados que junto com o corpo docente da Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp contribuíram de forma indispensável na minha formação profissional e pessoal.

Aos três grandes pilares que deixaram de estar fisicamente presentes na minha vida ao decorrer do doutorado: **Alda Maria, Wellington e Patrícia Málaga**. Logo na semana que recebi a notícia da aprovação nossa matriarca, vó Aldinha, se foi, dois anos após, no dia em que completariam 50 anos de casados, meu vô Málaga a melhor pessoa que já existiu na face da terra, foi ao seu encontro. E no final do quarto anos minha madrinha Patre que tanto admiro, responsável pela escolha da minha profissão. Sem sombra de dúvidas, quem eu sou hoje foi construído com a ajuda deles. Consigo sentir suas presenças e até sou capaz de ouvir: "Parabéns paixão de vó!", "Parabéns neguinha!" e "show de buela Fabinha!".

Aos meus pais **Nivaldo e Déborah** por todo apoio, incentivo e sacrifício realizado para que toda a minha formação fosse possível, aos meus irmãos **Alessandro e Andressa**, a minha cunhada **Cibele**, as minhas sobrinhas **Catarina e Antônia** que chegaram concretizando o ciclo da vida e enchendo meus dias de alegria. A toda minha família Málaga e Barreto, sempre presente fazendo sentir que nunca estou sozinha.

A **Ana Z. Gonçalves**, pela ajuda no desenho experimental do meu trabalho, nas análises estatísticas e principalmente por ser minha parça (insubstituível) nos treinos de Jiu-jitsu que junto com os treinos de Muay-Thai me ajudaram a extravasar e revigorar as energias diante dos vários obstáculos e frustrações encontradas nessa jornada.

A todos do laboratório de Toxicologia de Alimentos que colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho. Ao pessoal que mantém tudo em ordem para que possamos dedicar nosso tempo à pesquisa, aqui representado pela **Jessica e Gabriela** que mantinham nosso laboratório limpo e **Regiane**, responsável por deixar a vidraria pronta para o próximo experimento. A minhas colegas de bancada **Rafaelle Cordeiro e Andréa Bortolotte**, pela luta que travamos juntas para o mesmo objetivo com auxílio de **Santo Expedito** e a essencial **Patrícia Braga** (que merece um parágrafo exclusivo). À **Thamires Martins** companheira desde a seleção, inclusive nas escolhas erradas das disciplinas, ombro amigo que muitas vezes me viu chorar, infinitas

vezes escutou minhas reclamações. E depois do desabafo o coração acalmava e a mente clareava surgindo novamente um espaço para retomar a produção. Pelas risadas, bom momentos e comemorações nas vitórias alcançadas.

A **Pati**, pela qual tenho profunda admiração e respeito. Nosso "norte" no laboratório (quando me refiro a nós estou englobando minhas companheiras de laboratório, pois posso dizer com convicção que partilham da mesma opinião). Sempre disposta a nos ajudar, com colocações, conselhos e questionamentos pertinentes. Sem você nossa jornada seria muito mais árdua. Em nossas rodas de conversa, seu nome sempre estava presente. Quando surgia um problema, era logo seguido da frase: "Preciso falar com a Pati...", do mesmo modo, quando atingíamos o resultado tão desejado, ele vinha seguido da mesma frase: "Preciso contar para a Pati..."

A **Adriana Pavessi**, por todas as ajudas dadas nas correções dos meus textos, pela oportunidade de fazer estágio na docência, que contribuiu muito para o desenvolvimento da habilidade de falar para muitas pessoas e por ter me apresentado com a melhor estagiária que poderia ter, a Mari. Alegro-me e conforto-me saber que o futuro das nossas universidades está em mãos de pessoas competentes, cheias de energia e boas ideias, como ela.

A **Mariana Rodriguês**, por ter escolhido finalizar seu curso técnico de Análises de Alimentos do Colégio Técnico de Campinas (COTUCA) em nosso laboratório. Por todo trabalho desenvolvido, pelo seu comprometimento e responsabilidade, essenciais para finalização da segunda etapa do projeto.

Ao **Hamilton Hissano** que orgulhosamente elegi como meu co-orientador, pela orientação, ensinamentos compartilhados, conselhos, preocupação, envolvimento com o trabalho, pela confiança e principalmente pelo reconhecimento do meu trabalho e esforço.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e atenção dispensada na correção do trabalho e pelas sugestões.

A CAPES pelo fomento de recursos para o projeto e a A EMBRAPA- Meio Ambiente pela parceria estabelecida, a qual possibilitou a realização do ensaio com os peixes.

## RESUMO

A aquicultura é a atividade econômica que mais cresce no mundo, apresentando grande potencial de expansão no Brasil. A piscicultura representa cerca de 70% da produção, tendo na tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) uma das espécies mais representativas. Com a intensificação da atividade aquícola, o surgimento de bacterioses torna-se cada vez mais frequente, fazendo-se necessário o uso de antimicrobianos para o tratamento dos animais. O florfenicol é um dos antimicrobianos mais utilizados na aquicultura mundial, sendo usado por dez dos quinze maiores produtores de pescado. O medicamento é frequentemente administrado por via oral, através da ração medicada. Esse tipo de administração pode resultar em perdas do florfenicol para o meio aquático pela lixiviação do fármaco. Na maioria dos países produtores, o controle e fiscalização do uso e descarte de efluentes são falhos. Embora sua degradação seja relativamente rápida e não apresente potencial de bioacumulação, o uso recorrente garante sua presença nos canais aquíferos, podendo provocar danos no ecossistema aquático e favorecer o desenvolvimento de bactérias resistentes. Além disso, esse tipo de administração pode proporcionar interação entre o fármaco e a dieta resultando em mudanças na farmacocinética, bem como na absorção de nutrientes. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a lixiviação do florfenicol após 5 e 15 minutos de exposição na água com duas temperaturas (22 °C e 28 °C) e pH (4.5 e 8.0); avaliar a influência do tamanho do pélete e a interferência de três veículos (óleo vegetal, carboximetilcelulose e pectina com baixo teor de metoxilação) na lixiviação do fármaco; avaliar a digestibilidade aparente do florfenicol em tilápia-do-nilo (35g ± 2) a 26 °C e a atuação do medicamento na absorção de nutrientes da dieta. Os resultados mostraram que o tamanho do pélete, a forma de revestimento, a temperatura e o tempo de exposição afetam significativamente a lixiviação do fármaco ( $p < 0,05$ ), enquanto a faixa de pH estudada não interfere no processo. O revestimento com óleo vegetal foi o método mais eficiente na retenção do fármaco, enquanto o revestimento com carboximetilcelulose apresentou a maior lixiviação, liberando aproximadamente 60% na água após 15 minutos de exposição a 28 °C. O estudo da digestibilidade aparente mostrou que o coeficiente de digestibilidade do florfenicol é de 96% nas condições estudadas e o fármaco aumenta significativamente a digestibilidade aparente da proteína, energia bruta e matéria seca ( $p < 0,05$ ), enquanto que a digestibilidade aparente do lipídeo total não apresentou diferença significativa durante o tratamento.



## ABSTRACT

Aquaculture is the fastest growing economic activity in the world, presenting great potential for expansion in Brazil. Fish farming account for about 70% of production, being Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) one of the most important species. Along with aquiculture intensification, bacteriosis becomes more frequent making the use of antimicrobials necessary for its treatment. Florfenicol is one of the most used antimicrobials in global aquaculture, which is used by ten out the fifteen largest fish producers. The drug is often administered orally, through medicated feed. This kind of administration can result in losses to the aquatic environment by the florfenicol leaching. In most of these countries the control and supervision on the use and disposal of effluents are flawed. Although its degradation is relatively fast and does not present bioaccumulation potential, recurrent usage ensures its presence in aquifer channels, causing damage to the aquatic ecosystem and favoring the development of resistant bacteria. Furthermore this kind of administration may provide interaction between the drug and the diet resulting in changes in pharmacokinetics as well as in nutrient absorption. Therefore the aim of the present study was measure the florfenicol leaching incorporated in feed after 5 and 15 minutes of exposure at two temperatures (22 °C and 28 °C) and pH (4.5 and 8.0); Evaluate the influence of pellet size and interference of three binding agents (vegetable oil, carboxymethylcellulose and low methoxylation pectin) on the leaching of the drug was assessed; Evaluate the apparent digestibility of florfenicol in Nile tilapia (35g ± 2) at 26 °C and interference of the drug in nutrient absorption on a diet. The results showed that the pellet size, coating form, temperature and time of exposure significantly affect drug leaching ( $p < 0.05$ ), whereas our studied pH range does not interfere with the process. The coating with vegetable oil was the most efficient method in retaining the drug while coating with carboxymethylcellulose presented the highest leaching, releasing approximately 60% into the water after 15 minutes of exposure at 28 °C. The apparent digestibility study showed that the digestibility coefficient of florfenicol is 96% under the conditions studied and the drug significantly increases the apparent digestibility of the protein, crude energy and dry matter ( $p < 0.05$ ), on the other hand the drug have no significant effect on the total lipid content ( $p > 0.05$ ).

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I .....	13
INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS.....	13
<b>1. Introdução geral</b> .....	14
<b>2. Objetivos</b> .....	16
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	16
CAPÍTULO II .....	19
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
<b>1. Aquicultura: um mercado emergente</b> .....	20
<b>2. Uso de antimicrobianos na aquicultura</b> .....	23
2.1 <i>Florfenicol na aquicultura</i> .....	26
<b>3. Antimicrobiano: da aquicultura para o meio ambiente</b> .....	31
<b>4. Impactos dos antimicrobianos nos organismos aquáticos</b> .....	36
<b>5. Resistência bacteriana</b> .....	38
<b>6. Considerações finais</b> .....	41
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	41
CAPÍTULO III .....	52
EVALUATION OF THE LEACHING OF FLORFENICOL FROM COATED MEDICATED FISH FEED INTO WATER .....	52
<b>Abstract</b> .....	54
<b>1. Introduction</b> .....	55
<b>2. Materials and methods</b> .....	57
2.1 <i>Chemicals</i> .....	57
2.2 <i>Medicated feed preparation</i> .....	58
2.3 <i>Florfenicol quantitation in medicated feed and leachate</i> .....	59
2.4 <i>Leachate study experimental design</i> .....	62
<b>3. Results</b> .....	62
3.1 <i>Validation of analytical methods</i> .....	62
3.2 <i>Medicated feed: coating process</i> .....	63
3.3 <i>Florfenicol retention efficiency evaluation of the coating agents</i> .....	63
3.4 <i>Evaluation of pellet size effects on the leaching of florfenicol</i> .....	65
<b>4. Discussion</b> .....	67
<b>5. Conclusions</b> .....	70
<b>References</b> .....	71
CAPÍTULO IV .....	79

FLORFENICOL LOSSES IN TOP-COATING FISH FEED PELLETS AND BY LEACHING INTO WATER: ENVIRONMENTAL AND ECONOMIC IMPLICATIONS .....	79
<b>1. Introduction</b> .....	82
<b>2. Materials and Methods</b> .....	82
2.1 <i>Medicated feed preparation</i> .....	82
2.2 <i>Assessment of florfenicol losses in medicated feed preparation and by leaching into     water</i> .....	83
2.3 <i>Florfenicol quantitation in medicated feed and water</i> .....	83
2.4 <i>Statistical analysis</i> .....	84
<b>3. Results</b> .....	84
<b>4. Discussion</b> .....	86
<b>Acknowledgements</b> .....	87
<b>References</b> .....	87
CAPÍTULO V .....	89
<b>1. Introduction</b> .....	92
<b>2. Materials and methods</b> .....	94
2.1. <i>Ethical statement</i> .....	94
2.2. <i>Diets</i> .....	94
2.3. <i>Experimental procedures</i> .....	96
2.4. <i>Chemical analyses</i> .....	97
2.5. <i>Florfenicol quantitation in medicated feed, feces and water</i> .....	97
2.6. <i>Statistical analyses</i> .....	99
<b>3. Results</b> .....	100
3.1. <i>Digestibility of florfenicol, crude protein, total lipid and dry matter and florfenicol     residues into the water</i> .....	100
3.2. <i>Method validation</i> .....	100
<b>4. Discussion</b> .....	102
<b>5. Conclusion</b> .....	104
<b>Acknowledgment</b> .....	104
<b>References</b> .....	104
CAPÍTULO VI .....	109
DISCUSSÃO GERAL.....	109
CAPÍTULO VII .....	123
CONCLUSÃO GERAL.....	123
CAPÍTULO VIII .....	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	126
ANEXO.....	141



**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS**

## 1. Introdução geral

A produção e consumo mundial de pescado aumentaram gradativamente nas últimas décadas. Em 2014, a pesca extrativa e a aquicultura forneceram cerca de 167 milhões de toneladas de produtos (excluído plantas aquáticas), sendo 146 milhões de toneladas destinadas ao consumo humano. O desenvolvimento da aquicultura, cuja contribuição passou de 5% para 45% entre os anos de 1960 e 2014, está relacionado com o grande crescimento do setor. Países em crescente expansão como o Brasil têm englobado uma fatia significativa desse mercado. Em 2014 o país ocupou a 11<sup>a</sup> posição no *ranking* mundial de produção por aquicultura, totalizando um rendimento de 562,5 mil toneladas de produtos (FAO, 2016).

A maior parte da produção por aquicultura é representada pela piscicultura. O pescado está entre os alimentos mais comercializados no mundo, representando 1% do comércio mundial em termos de valor (FAO, 2016). Em 2014, somente a produção de tilápia-do-nilo rendeu aproximadamente 8,8 bilhões de dólares, com produção de 5,3 milhões de toneladas, representando a segunda espécie mais produzida (FAO, 2017). Estima-se que em 2030 a produção ultrapasse oito milhões de toneladas (MSANGI et al., 2013).

A espécie nativa africana, que se encontra distribuída em mais de 130 países, apresentou rápido crescimento de produção nas últimas duas décadas, expandindo principalmente na Ásia, América do Sul e África (FAO, 2016). O aumento da produção e propagação da espécie está relacionado com a facilidade de adaptação às diversas condições de criação, ter pouca susceptibilidade às doenças parasitárias, possuir características sensoriais agradáveis na carne e filé sem espinhas intramusculares em “Y”. Além do mais, possui um excelente índice produtivo, uma vez que possui rápida taxa de crescimento e curto ciclo de engorda (OSTRENSKY et al., 2008).

Com a intensificação da produção há consequente aumento do estresse mecânico, social e ambiental, que resulta na depressão no sistema imune e favorece o desenvolvimento de bactérias oportunistas (SHAO, 2001). Para tratar ou prevenir essas infecções os produtores utilizam antimicrobiano (KUMMERER, 2009).

O florfenicol é um dos antimicrobianos mais empregados na aquicultura mundial (NORAMBUENA et al., 2013). Desenvolvido especificamente para uso veterinário, atua como bacteriostático impedindo a síntese proteica bacteriana, abrangendo amplo espectro de ação, sendo efetivo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SOTO et al., 2010). O maior representante comercial é o Aquaflor (premix 50% de florfenicol) desenvolvido exclusivamente para aquicultura pela Schering Plough®, em 1990 (HAYES, 2013). Comercializado em 25 países é administrado preferencialmente por via oral por meio da incorporação à ração (FERREIRA ET AL., 2007).

A associação do fármaco na ração pode ser feita através de sua adição durante o processo de obtenção da ração (extrusão) ou através do revestimento da ração já pronta com auxílio de um veículo. A técnica de revestimento é a mais utilizada e a pesar de ser bastante eficiente, pode provocar interação medicamentosa, alterando a farmacocinética (MOULY et al., 2017), bem como a absorção de nutrientes da dieta (REDA et al., 2013), além disso, a técnica apresenta ainda problemas de homogeneização e perda do fármaco para água (ZARZA, 2012).

A lixiviação do fármaco para água está relacionada com os parâmetros físico-químicos da água, assim como as características moleculares do medicamento, sua dosagem, frequência e tempo de exposição (POULIQUEN et al., 2007). Embora o florfenicol tenha baixo caráter de adsorção em sedimentos e tempo de meia vida curto, é possível encontrá-lo nessas matrizes devido à aplicação excessiva e recorrente (CHRISTENSEN et al., 2006; SUN et al., 2010; MARTINS; GUIMARÃES; GUILHERMINO, 2013).

Os resíduos de antimicrobiano gerados pela aquicultura, somados com outras fontes de contaminação, podem resultar em um desequilíbrio no ecossistema aquático, podendo afetar funções vitais, crescimento e reprodução de diversas espécies da microflora e a microfauna local. Como esses organismos são a base da cadeia alimentar, mudanças na composição das espécies ou na biomassa podem resultar em respostas potenciais ao ecossistema (Lei et al., 2009; MARTINS; GUIMARÃES; GUILHERMINO, 2013; LIU et al., 2012).

Somados à ecotoxicidade gerada pela presença de resíduos de antimicrobianos, estão os problemas provocados pelo desenvolvimento da resistência bacteriana. Ao entrar em contato com subdosagens terapêuticas esses microrganismos

podem desenvolver mecanismos adaptativos, tornando-se resistentes ao fármaco (DONE; VENKATESAN; HALDEN, 2015) e os genes de resistência adquiridos podem ser transferidos a outras bactérias. O ambiente aquático funciona como um reservatório de genes resistentes e pode ser uma fonte de propagação direta e indireta, afetando não só a fauna aquática (STOLL et.al., 2012).

Diante da problemática apresentada acima, surgiu a idéia do desenvolvimento do trabalho, cujos objetivos estão citados a seguir:

## 2. Objetivos

- 1) Avaliar um novo veículo para incorporar o fármaco na ração;
- 2) Desenvolver e validar metodologias analíticas para quantificar a concentração de florfenicol nas rações medicadas, nas fezes e na água;
- 3) Quantificar a perda do fármaco para a água a partir de diferentes formas de recobrimento disponíveis no mercado, comparando com o novo veículo elaborado;
- 4) Avaliar a interferência do tamanho do pélete na lixiviação do fármaco;
- 5) Avaliar a digestibilidade aparente da ração medicada com florfenicol, em tilápia-do-nilo, quantificando a porção excretada nas fezes e a interferência do fármaco na absorção de nutrientes presentes na dieta.

## Referências Bibliográficas

- CHRISTENSEN, A. M.; INGERSLEV, F.; BAUN, A. Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 25, n. 8, p. 2208–2215, 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.
- DONE, H. Y.; VENKATESAN, A. K.; HALDEN, R. U. Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture ? **The AAPS Journal**, v. 17, n. 3, 2015.
- FAO 2016 (Food and Agriculture Organization). The state of world fisheries and



- aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 2016.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. FishStat Plus. Fishery statistical collections. Released: March 2017. Italy, Rome. Available at: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/en>.
- FERREIRA, C. S. G.; NUNES, B. A.; ENRIQUES-ALMEIDA, J. M. M.; GUILHERMINO, L. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 452-458, 2007.
- HAYES, J. Determination of florfenicol in fish feeds at high inclusion rates by HPLC-UV. **Journal of AOAC International**, v. 96, p. 1-7, 2013.
- KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**, v. 75, p. 417-434, 2009.
- LAI, H.; HOU, J., SU, C.; CHEN, C. Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 329–334, 2009.
- LIU, W. et al. Plant Physiology and biochemistry impacts of florfenicol on marine diatom *Skeletonema costatum* through photosynthesis inhibition and oxidative damages. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 60, p. 165–170, 2012.
- MARTINS, A.; GUIMARÃES, L.; GUILHERMINO, L. Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to *Daphnia magna* assessed at two temperatures. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, p. 1022–1032, 2013.
- MOULY, S., C. LLORET-LINARES, P. O. SELLIER, D. SENE, AND J. F. BERGMANN. Is the clinical relevance of drug-food and drug-herb interactions limited to grapefruit juice and Saint-John's Wort? **Pharmacological Research**, v. 118, p. 82–92, 2017.
- MSANGI, S. et al.. Fish to 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture. World Bank Report 83177-GLB. Washington, DC: World Bank, 2013.
- 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.

- POULIQUEN, H. et al. Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline oxolinic acid , flumequine and florfenicol ) in deionised water , freshwater and seawater under abiotic conditions. **Aquaculture**, v. 262, p. 23–28, 2007.
- REDA, R. M.; IBRAHIM, R. E.; AHMED, E. N. G.; EL-BOUHY, Z. M. Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 39, p. 241–248, 2013.
- SHAO, Z. J. Aquaculture pharmaceuticals and biological: current perspectives and future possibilities. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, p. 229-243, 2001.
- SOTO, E.; ENDRIS, R. G.; HAWKE, J. P. *In vitro* and *in vivo* efficacy of florfenicol for treatment of *Francisella asiatica* infection in Tilapia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 4664-4670, 2010.
- STOLL, C.; SIDHU, J. P. S.; TIEHM, A.; TOZE, S. Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water sample collected from Germany and Australia. **Environment Science Technology**. v.46, p. 9716-9726, 2012.
- SUN, Y. et al. Fate of florfenicol in a simulated aquatic ecosystem and effects on sediment microflora. **Water Environmental Research**, v. 84 p. 1–6, 2010.
- 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.

CAPÍTULO II  
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## **1. Aquicultura: um mercado emergente**

Segundo estimativas da FAO (Food and Agriculture Organization), em 2050 a população mundial alcançará 9 bilhões de pessoas. Entre os anos de 2014 e 2016, uma em cada dez pessoas encontravam-se no estado de subnutrição. Em outro extremo encontra-se a parcela com sobrepeso que, nesse mesmo período, englobou 30% da população mundial. A procura por alimentos saudáveis capazes de equalizar essa disparidade está cada vez maior (FAO, 2014; FAO, 2016).

O pescado é uma fonte de proteína de excelente qualidade: 150 gramas de peixe fornecem de 50 a 60% das necessidades proteicas diárias de um adulto, além de conter todos os aminoácidos essenciais e ser capaz de fornecer ácidos graxos essenciais, como o ômega 3, vitaminas (A, D e B) e minerais (cálcio, zinco, iodo, ferro e selênio). O impacto na dieta pode ser significativo até mesmo quando a porção ingerida é baixa (FAO, 2016).

O consumo do produto está aumentando gradativamente nos últimos anos. No período compreendido entre 1960 e 2013, a ingestão média mundial do produto quase dobrou, passando de 9,9 kg/habitante/ano para 19,7 kg/habitante/ano (Tabela 1) (FAO, 2016). Estimativas preliminares falam de aumento de 30% entre 2010 e 2030 (MSANGI, et al., 2013). O consumo médio do produto no Brasil ainda é inferior à média mundial, mas apresentou crescimento de aproximadamente 50% entre os anos de 1999 e 2011, passando de 6,15 kg/habitante/ano para 11,17 kg/habitante/ano (FAO, 2016).

A mudança nos hábitos alimentares da população mundial e o aumento do consumo de pescado vêm sendo acompanhado pelo crescimento da produção pesqueira e da aquicultura (FAO, 2012). O comércio mundial de peixe para consumo humano expandiu muito nas últimas décadas, com aumento de 515% entre os anos de 1976 e 2014. Atualmente, o pescado está entre os alimentos mais comercializados no mundo, representando 1% do comércio mundial em termos de valor (FAO, 2016).

A contribuição da aquicultura no fornecimento de pescado mundial cresce constantemente, ao passo que a pesca por captura apresenta-se praticamente estagnada desde 1980. Em 2014, a pesca extrativa e a aquicultura forneceram cerca de 167 milhões de toneladas de produtos (excluindo-se plantas aquáticas). A aquicultura marinha foi responsável pela produção de 26,7 milhões de toneladas, enquanto que a aquicultura continental representou quase o dobro, com aproximadamente 47,1 milhões

de toneladas. O desenvolvimento desta atividade, cuja contribuição passou de 5% para 45% entre os anos de 1960 e 2014, tem sido responsável pelo grande crescimento do setor (FAO, 2016).

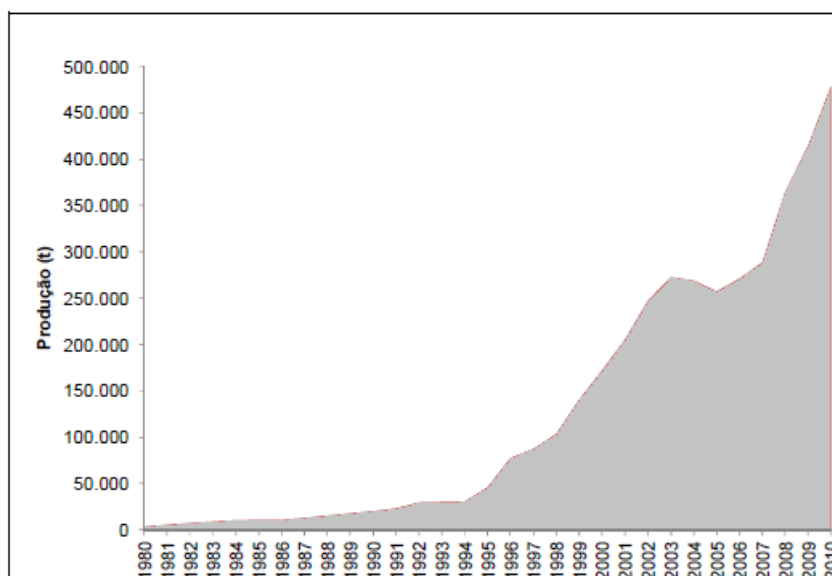
**Tabela 1.** Consumo médio per capita de pescado no mundo entre 1960 e 2013 (FAO, 2016).

<b>Ano</b>	<b>Consumo médio (kg/habitante/ano)</b>
1960	9,9
1970	11,5
1980	12,6
1990	14,4
2000	17,0
2010	18,5
2013	19,7

A piscicultura representa aproximadamente 70% da produção por aquicultura. A China é atualmente o maior produtor de pescado do mundo, sendo responsável por 55% da produção mundial, seguido pela Índia (9%), Indonésia (7,3%) e Vietnã (5,4%). Em 2014, o Brasil contribuiu com 0,95% da produção mundial (FAO, 2016).

Contudo, apesar da participação ainda pouco expressiva, o Brasil dispõe de características favoráveis para se tornar um dos maiores produtores e exportadores de peixes e produtos derivados no mundo. Com 7367 km de costa, 9 milhões de hectares em água e reservatórios hidroelétricos, clima predominantemente tropical que favorece a criação de diversas espécies aquáticas e 13,8% da água doce disponível no mundo, o país possui um potencial natural para o desenvolvimento da aquicultura (OSTRENSKY et al., 2008).

Confirmando essas previsões, a produção aquícola brasileira cresce significativamente desde a metade da década de 1990 (Figura 1). Somente no período compreendido entre os anos de 2008 e 2010, a produção aquícola no Brasil cresceu cerca de 30%, sendo a aquicultura continental a maior responsável por esse aumento (MPA, 2010).



**Figura 1.** Produção nacional de pescado por aquicultura (marinha e continental), de 1980 a 2010, em toneladas (t) (MPA, 2010).

O crescimento seguiu contínuo nos anos subsequentes. Enquanto que em 2009 o Brasil ocupou a 18ª posição no ranking mundial de produção por aquicultura, em 2014 saltou sete posições e apossou-se da 11ª, totalizando um rendimento de 562,5 mil toneladas de produtos (FAO, 2016). No ano seguinte o aumento foi de 6%. Mais de 80% da aquicultura nacional é representada pela criação de peixes, com produção de 483 mil toneladas em 2015. O estado de Rondônia lidera o mercado com 17,5% da produção nacional, seguido pelo Paraná (14,3%) e Mato Grosso (9,8%). As espécies de maior destaque no país são: tilápia, tambaqui, tambacu e carpa (IBGE, 2015).

A tilápia representa a *commodity* de maior importância no cenário aquícola nacional. Sua criação equivale a 45,4% da piscicultura nacional (IBGE, 2015). A espécie nativa africana foi introduzida no país em 1952, quando o governo do estado de São Paulo inseriu algumas espécies em represas estaduais, com a finalidade de controlar a proliferação de macrófitas. No decorrer dos anos foram feitos diversos investimentos para garantir a adaptação da espécie em águas brasileiras. No ano de 2002, com a introdução de duas linhagens melhoradas (GenoMar Supreme Tilapia e FishGen) e o uso de técnica de reprodução artificial com controle de sexo, iniciou-se a fase industrial da tilapicultura brasileira (OSTRENSKY et al., 2008).

As condições climáticas do país são excelentes para a criação da espécie e sua criação não ficou restrito ao estado de São Paulo. Atualmente a produção encontra-

se distribuída em quase todo território nacional, com exceção do estado do Amazonas, onde a cultura é proibida com o propósito de preservar espécies nativas. As regiões Sul e Sudeste são os maiores produtores, com destaque para o estado do Paraná (IBGE, 2015).

A grande aceitação e propagação da criação de tilápia estão relacionadas com a facilidade de se adaptar as diversas condições de criação, ter pouca susceptibilidade a doenças parasitárias, possuir características sensoriais agradáveis na carne e filé sem espinhas intramusculares em “Y”. Além do mais, possui um excelente índice produtivo, uma vez que apresenta rápida taxa de crescimento e um curto ciclo de engorda (em menos de cinco meses um alevino de 10 gramas pode atingir 700g) (OSTRENSKY et al., 2008).

Adverso à criação da tilápia que ocupa todo território nacional devido à robustez, a criação de peixes redondos, espécies nativas de grande relevância no país, fica restrito aos estados do Norte e Centro-Oeste. Esses animais são vulneráveis a grandes variações de temperatura, preferindo ambientes mais quentes com água rica em nutrientes. Pertencem a esse grupo o tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piractus mesopomcus*) e tambacu (híbrido das duas espécies). O tambaqui, também conhecido como pacu vermelho, é a segunda espécie mais criada no país, representado 28,1% da produção nacional, seguido do tambacu (7,7%), enquanto que o pacu ocupa a quinta posição no *ranking* com 2,7%. A produção é realizada predominantemente em sistemas de criação intensivo e semi-intensivo (IBGE, 2015; VALLADÃO, 2016; SENHORINI; FORESTI, 2012).

## **2. Uso de antimicrobianos na aquicultura**

A aquicultura pode ser realizada em sistemas de criação intensivo, semi-intensivo ou extensivo. No sistema extensivo, há pouco controle da produção, o espaço para criação varia de tamanho e profundidade, e a maior parte da alimentação animal é proveniente do próprio ambiente de criação, ou seja, de fontes naturais. Este sistema usa uma baixa proporção de insumos por unidade de produto. Já, no sistema intensivo, a maior parte (ou toda alimentação) é proveniente de fonte externa ao meio. O sistema possui uma concentração maior de animais por área, necessitando de monitoramento intensificado para manter as características necessárias ao desenvolvimento saudável das espécies e exigindo nível tecnológico elevado. Por fim, o sistema semi-intensivo é

caracterizado pelo fornecimento de elementos que têm por objetivo aumentar a produção, como o suplemento de ração e uso de medicamentos, além de um controle parcial da produção (ONU, 2000; OSTRENSKY et al., 2008; CYRINO et al., 2010).

Enquanto os sistemas extensivos raramente são utilizados para fins econômicos (normalmente destinados ao lazer e subsistência dos donos das propriedades), os sistemas intensivos e semi-intensivos são os responsáveis pela maior parte da produção aquícola mundial (FAO 2016) e, embora proporcionem um aumento da produtividade (OSTRENSKY et al., 2008), as alterações provocadas no meio pelo excesso de matéria orgânica e densidade populacional podem afetar os animais, além de acarretar uma série de danos ambientais (NAYLOR et al., 2000; DIANA, 2009; MARTINEZ-PORCHAS et al., 2012).

Devido às condições a que é submetido, o animal muitas vezes se depara com situações estressantes, como o manejo inadequado, altas densidades de estocagem, variações térmicas e mudanças na qualidade da água. Esse cenário pode resultar em impactos imunológicos negativos. O aumento da concentração plasmática de cortisol (hormônio responsável por induzir a imunossupressão) gerado pelo estresse reduz a resistência dos peixes às infecções bacterianas e virais (CABELLO, 2006; CYRINO et al., 2010). Com o sistema imunológico deprimido, patógenos oportunistas se instalam, causando a maioria das infecções que acometem os animais (SHAO, 2001).

Doenças infecciosas podem causar grandes perdas na produção e problemas no bem-estar animal. Diante disso, faz-se necessário o uso de medicamentos veterinários para contornar esses incidentes (KUMMERER, 2009). A administração de antimicrobiano na piscicultura pode ser de duas maneiras: por dispersão na água ou através da alimentação. Essas formas de aplicação evitam o acúmulo do fármaco em um determinado tecido, como ocorreria pela via intramuscular (FAO, 2006). A via oral é mais vantajosa, uma vez que é necessária uma quantidade menor do fármaco quando comparada à sua dispersão na água (FERREIRA et al., 2007).

Para ser administrado pela alimentação, o medicamento precisa ser previamente incorporado à ração. A incorporação pode ser feita através da adição do fármaco durante o processo de obtenção da ração (extrusão) ou através do revestimento da ração já pronta com auxílio de um veículo. Na extrusão, o fármaco é colocado junto com os ingredientes da ração no misturador e a mistura obtida é posteriormente extrusada. Na técnica por revestimento, o fármaco é suspenso em um veículo, (geralmente óleo vegetal ou de peixe) e essa suspensão é vertida sobre a ração em um



misturador, no qual ocorre a incorporação. Apesar de ser mais eficiente, essa técnica ainda apresenta problemas de homogeneização, adaptabilidade e perda do fármaco para água (ZARZA, 2012).

Dentre os medicamentos usados na aquicultura, os antimicrobianos são aplicados em larga escala tanto para fins terapêuticos como profiláticos, ou seja, para tratar ou prevenir infecções (KUMMERER, 2009). Entretanto, estimar a quantidade e os tipos de antimicrobiano que estão sendo usados torna-se um desafio. Pesquisas usando questionários eletrônicos e entrevistas através de visitas nas propriedades estão sendo realizadas em diversos lugares do mundo. Porém, com receio das consequências e impactos negativos, muitos fazendeiros e técnicos não fornecem as informações reais (ALDAY-SANZ et al., 2012; TUŠEVLJAK et al., 2012; XINHUA et al., 2012). Outro fator que dificulta a coleta de dados é a falta de legislação e fiscalização dos órgãos responsáveis, principalmente em países em desenvolvimento (SAPKOTA et al., 2008).

A escassez de antimicrobianos específicos para a aquicultura faz com que os produtores utilizem medicamentos de outras espécies animais (SERRANO, 2005). No Brasil, apenas o florfenicol e a oxitetraciclina são permitidos na aquicultura. Em 2010 foram os fármacos mais utilizados na aquicultura mundial, sendo que o florfenicol apareceu em primeiro lugar (52%) seguido pela oxitetraciclina (44%). Também foram relatados o uso de flumequina e ácido oxolínico que juntos representaram apenas 1% do consumo (NORAMBUENA et al., 2013).

Estima-se que mais de 36 tipos diferentes de antimicrobianos estão sendo usados pelos maiores aquicultores mundiais (China, Índia, Vietnã, Indonésia, Tailândia, Bangladesh e Filipinas), pertencendo às classes dos aminoglicosídeos,  $\beta$  lactâmicos, macrolídeos, nitrofuranos, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclina e fenicóis. Há indícios inclusive de uso de medicamento banido da aquicultura asiática, como o cloranfenicol (RICO et al., 2012).

Um estudo envolvendo 252 fazendas de criação de tilápia, camarão e *Catfish* em Bangladesh, China, Tailândia e Vietnã, mostrou que 100% das fazendas envolvidas na criação de *Catfish* usaram algum tipo de antimicrobiano entre 2011 e 2012, sendo que 10% relataram usar de cinco a seis tipos de antimicrobiano diferentes. Na região estudada, os antimicrobianos mais aplicados foram a oxitetraciclina, amoxicilina, florfenicol e enrofloxacin. O uso profilático foi relatado em 5% dos casos (RICO et al., 2013).

O recorrente uso das drogas veterinárias é percebido em todos continentes. No Chile, o aumento pode ser observado claramente na criação de salmão. As infecções bacterianas acompanham a produção desde sua introdução no país em meados da década de 1970, e desde então, o uso de antimicrobiano vem crescendo, superando o aumento da produção. Entre os anos de 2000 e 2008 a produção de salmão cresceu aproximadamente 54%. Já, o consumo de antimicrobiano nessa cultura cresceu 460%. Dentre os mais utilizados na produção (ácido oxolínico, flumequina, oxitetraciclina, eritromicina, amoxicilina, florfenicol e sulfa trimetropim), o florfenicol foi o que apresentou maior aumento, passando de aproximadamente 1g por tonelada de salmão produzido em 1999 para 300g por tonelada em 2008 (BRAVO, 2012).

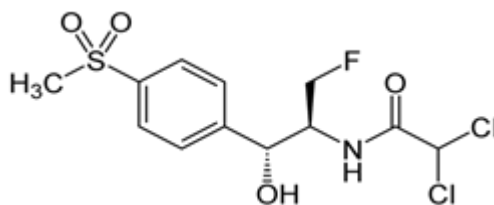
Por outro lado, em alguns países, como os pertencentes à União Europeia, o uso de antimicrobianos é bastante controlado. Na Noruega, maior produtor mundial de salmão do Atlântico, o uso de medicamentos é acompanhado rigidamente por profissionais. Dessa forma, todos os medicamentos destinados para uso animal devem ser prescritos por um médico veterinário e dispensados por um farmacêutico. Na aquicultura, uma cópia de toda prescrição deve ser encaminhada para o diretório de pesca, descrevendo o diagnóstico, o peso e a espécie animal, a posologia, a data do início do tratamento e a localização da fazenda (LILLEHAUG; LUNESTAD; GRAVE, 2003). Em 2013 a aquicultura norueguesa consumiu 972 quilos de antimicrobiano, sendo aproximadamente dois terços representados pelo ácido oxolínico e um terço pelo florfenicol (NIPH, 2017).

Infelizmente, a aquicultura norueguesa não representa a realidade mundial. A falta de informação por parte dos produtores, o escasso número de antimicrobianos permitidos, a falta de profissionais qualificados e fiscalização governamental acabam, de certa forma, incentivando o uso inadequado e indiscriminado dos antimicrobianos em diversos países (RICO et al., 2013).

### 2.1 *Florfenicol na aquicultura*

O florfenicol é um antimicrobiano sintético desenvolvido especificamente para uso veterinário. Surgiu na década de 1990 para substituir o cloranfenicol, medicamento altamente tóxico (podendo causar anemia aplástica em humanos) e de grande importância para o tratamento da febre tifoide (KOWALSKI et al., 2005; LI, 2008; WONGTAVATCHAI et al. 2005). Sua ação antibacteriana é atingida em doses

terapêuticas menores, sendo eficaz inclusive contra bactérias resistentes ao cloranfenicol (MICHAEL et al., 2003). A estrutura dos dois compostos é similar, havendo uma substituição do grupo *p*-nitro do anel aromático do cloranfenicol por um grupo sulfonilmetil no florfenicol (Figura 2).



**Figura 2.** Estrutura química do florfenicol.

Possui alto pKa (9,0) e baixa solubilidade em solventes aquosos ( $1,32 \text{ g L}^{-1}$  em pH 7,0), características que lhe conferem boa penetração nos tecidos (SCHWARZ et al., 2004; LIM et al., 2010). Embora tenha baixo caráter de adsorção em sedimentos ( $K_{ow} = 2,36$ ) e tempo de meia vida curto (de 1,7 a 4,5 dias em sedimentos e de 1,7 a 7,3 dias em meio aquoso), é possível encontrá-lo nessas matrizes devido à aplicação excessiva e recorrente (CHRISTENSEN et al., 2006; SUN et al., 2010; MARTINS; GUIMARÃES; GUILHERMINO, 2013).

O medicamento atua como bacteriostático, impedindo a síntese proteica bacteriana, abrangendo um amplo espectro de ação, sendo efetivo contra bactérias Gram-positivas e negativas, tais como *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*, *Streptococcus iniae*, *Listonella anguillarum* e *Edwardsiella ictaluri*, entre outras (SOTO et al., 2010).

O primeiro produto registrado para uso aquícola foi o Aquaflo, produzido pela Schering-Plough em 1990. Sua formulação corresponde a um premix com 50% de florfenicol. O medicamento apresenta boa palatabilidade para o peixe, podendo ser usado em qualquer fase da criação, tendo uso aprovado na aquicultura de 25 países (HAYES, 2013), dentre eles: Japão, Noruega, Chile, Canadá, Reino Unido, Equador, Estados Unidos, Venezuela, Colômbia, Brasil, Costa Rica, Vietnã e China (GAIKOWSKI et al., 2010).

No Brasil, o produto está aprovado desde 2007 (ADILSON et al., 2016), para o tratamento de espécies de tilápia e seus híbridos com septicemia hemorrágica causada por *Aeromonas sp* e estreptococoses proveniente de *Streptococcus agalactiae*.

Em truta arco-íris, o medicamento é indicado para doença da boca vermelha provocada por *Yersinia ruckerii*. A dosagem recomendada é de 20 mg do medicamento por quilo de peixe vivo, por dez dias consecutivos. Além do Aquaflor, está disponível no país o FF-50® (florfenicol 50%), produzido pela empresa Fav do Brasil sendo indicado para o tratamento de tilápia-do-nylo (40 mg kg<sup>-1</sup>, por 10 dias), e truta arco-íris (20 mg kg<sup>-1</sup>, por 10 dias) acometidas por infecções causadas por bactérias Gram-positivas e/ou Gram-negativas sensíveis ao florfenicol (SCHERING-PLOUGH, 2015; SINDAN, 2017).

Nos Estados Unidos o Aquaflor tem uso aprovado para o tratamento de septicemia entérica causada por *Edwardsiella ictaluri* em *catfish*, controle de mortalidade e furunculose associadas à *Flavobacterium psychrophilum* e *Aeromonas salmonicida* em salmonídeos de água doce, septicemias causada por *Streptococcus iniae* e controle de mortalidade devido à infecção por *Flavobacterium columnare* (FDA, 2015).

Na aquicultura asiática o medicamento é usado majoritariamente nas culturas de camarão, tilápia e panga (*Pangasius hypophthalmus*) para tratar furunculoses, vibrioses e estreptococose, sendo também a droga de escolha na ausência de diagnóstico preciso. A administração via oral, através da ração medicada, é a forma mais usual de tratamento e apesar de a dosagem recomendada ser de 10 mg kg<sup>-1</sup> de peixe vivo durante 10 dias consecutivos, alguns produtores, ao notarem que o medicamento não apresenta mais a mesma eficiência do passado, aplicam dosagens maiores por mais tempo. Além de uso terapêutico, o medicamento é também destinado para fins profiláticos e como promotor de crescimento (HE; ZHOU; LIU, 2012; LI et al., 2016; LIU; CALEB; MENG, 2017; MO et al., 2017).

Na salmonicultura, o medicamento é usado pelos quatro maiores produtores mundiais (Noruega, Chile, Inglaterra e Canadá) no tratamento de furunculose. A posologia é mesma recomendada para outras espécies (10 mg kg<sup>-1</sup> por 10 dias). No Chile, o medicamento ainda é utilizado para o tratamento de infecções causadas por *Piscirickettsia salmonis*, patógeno de maior relevância do país, sendo o antimicrobiano mais usado na produção nacional, representando 81% do consumo total. Somente no ano de 2015 o país usou em torno de 450 toneladas do produto. Em 2013 a Noruega empregou 0,3 toneladas do produto, aproximadamente mil vezes menos que o Chile no mesmo ano (BRAVO, 2012; BURRIDGE et al., 2010; SERNAPESCA, 2017; NIPH, 2017).

A farmacocinética do fármaco foi estudada em diferentes espécies de peixes (Tabela 2). De maneira geral, o medicamento apresenta rápida absorção, com boa distribuição pelo organismo e excreção pelas vias: branquial, hepatobiliar e renal. Devido a grande superfície de contato, vasta vascularização e a facilidade de troca entre o sangue e a água pelo contato próximo, as brânquias são consideradas uma das mais importantes vias de eliminação de xenobióticos nos peixes (FENG; JIA, 2009; FENG; JIA; LI et al., 2008).

A rápida absorção ( $T_{max} = 4$  h; tabela 2) e eliminação extremamente lenta ( $T_{1/2\beta} = 51,2$ h; tabela 2) observada em *Paralichthys olivaceus*, peixe marinho de grande importância na Coreia, pode ser explicada pelas características fisiológicas e morfológicas da espécie. Peixes marinhos possuem pH estomacal e intestinal mais elevado. Dessa forma, moléculas com alto valor de pKa não são ionizadas no estômago, sendo rapidamente absorvidas. Porém, esses peixes possuem brânquias com menor superfície de contato, baixos níveis de hemoglobina e hematócritos e baixa pressão arterial, retardando a excreção (LIM et al., 2010). Por outro lado, tempos de meia vida curtos sugerem que a administração do fármaco deve ser feita em intervalos de tempo menores, garantindo assim que a concentração nos sítios alvo permaneça com a concentração mínima inibitória para o patógeno a que se destina (MARTINSERP et al., 1993).

**Tabela 2.** Estudos farmacocinéticos do florfenicol em diferentes espécies de peixes

Espécie	Condições da água		Via de administração	músculo			plasma			B (%)	Referência
				T <sub>max</sub>	C <sub>max</sub>	T <sub>1/2β</sub>	T <sub>max</sub>	C <sub>max</sub>	T <sub>1/2β</sub>		
<i>O. niloticus</i>	28°C	Água salobra (16,5‰)	suspensão oral	12h	3,6 µg g <sup>-1</sup>	6,73h	-	-	-	-	FENG; JIA; LI, 2008
<i>O. aureus</i>		Água doce		12h	4,59 µg g <sup>-1</sup>	8,03h	-	-	-	-	
<i>O. niloticus</i> <i>O. aureus</i>	22°C	Água doce	suspensão oral	12h	6,88 µg g <sup>-1</sup>	10,97h	-	-	-	-	FENG; JIA, 2009
<i>I. punctatus</i>	25°C	Água doce	ração medicada* gavagem	-	-	-	9,2h	7,6 µg g <sup>-1</sup>	9,1h	-	LANGSTON; GAO, 2011
<i>P. brachypomus</i>	25°C	Água doce	Intra-muscular de Nunflor	-	-	-	3h	1,1 mcg/mL	4,3h	-	LEWBART; PAPICH; STREET, 2005
<i>P. olivaceus</i>	18°C	Água salobra (33‰)	suspensão oral	-	-	-	4h	12,81 µg g <sup>-1</sup>	51,2h	0,43	LIM et al., 2010
<i>P. fulvidraco</i>	25°C	Água doce	suspensão oral	6,3h	2,59 µg g <sup>-1</sup>	7,3h	5h	4,29 µg g <sup>-1</sup>	15,8h	-	YANG et al., 2013
<i>E. coioides</i>	23°C	Água salobra (33‰)	ração medicada gavagem	21,6h	4 µg g <sup>-1</sup>	12,3h	4h	28,3 µg g <sup>-1</sup>	11,6h	-	FENG et al., 2016
<i>Gadus morhua</i>	8°C	Água salobra (33‰)	ração medicada* gavagem	-	-	-	7h	10,1 µg g <sup>-1</sup>	39h	0,91	SAMUELSEN; BERGH; ERVIK, 2003
<i>Silurus asotus</i>	23°C	Freshwater	via oral	8h	9,59 µg g <sup>-1</sup>	15,7h	-	-	11,1h	0,93	PARK; LIM; YUN, 2006
<i>Salmo salar</i>	23°C	Água salobra (30‰)	ração medicada gavagem	-	-	-	10,3h	4 µg g <sup>-1</sup>	12,2h	0,965	MARTINSERP et al., 1993

T<sub>max</sub>, tempo para atingir a maior concentração; C<sub>max</sub>, concentração máxima atingida; T<sub>1/2β</sub>, tempo de meia vida; B, biodisponibilidade.

\* ração medicada com Aquafloor

### 3. Antimicrobiano: da aquicultura para o meio ambiente

Na aquicultura os fármacos administrados via ração podem contaminar o meio aquático por três vias diretas. A primeira é logo na aplicação: ao entrar em contato com a água o fármaco contido na ração pode lixiviar, sendo a quantidade perdida relacionada com os parâmetros físico-químicos da água (pH, temperatura, incidência de luz e concentração de oxigênio dissolvido, por exemplo), assim como com as características moleculares do medicamento, sua dosagem, frequência e tempo de exposição. As outras duas vias de contaminação ocorrem após a ingestão da ração medicada. Sabe-se que parte do fármaco não é absorvida pelo trato gastrointestinal, podendo ser excretada de forma inalterada nas fezes, que por lixiviação pode contaminar o meio, enquanto que a parte absorvida pode ser parcialmente metabolizada e eliminada de forma inalterada pelas brânquias, fezes e urina. Nesta segunda etapa, a farmacocinética do fármaco na espécie animal é o principal interferente (FDA, 2004; POULIQUEN et al., 2007).

Poucos estudos avaliando a lixiviação de antimicrobianos estão disponíveis na literatura. A lixiviação da oxitetraciclina (em 5, 10, 15 e 25 minutos) presente em rações para truta e *catfish* (com composição nutricional distinta), em água com temperatura de 20 °C e 30 °C foi avaliada por Xu e colaboradores (1994). O medicamento foi incorporado na ração por dois mecanismos: por recobrimento e misturado nos ingredientes antes da peletização. Os resultados indicaram que: i) quanto maior a temperatura da água, maior a perda; ii) quanto mais tempo em contato com a água, mais medicamento é lixiviado; iii) a composição nutricional da ração influencia na quantidade de fármaco lixiviado; iv) a densidade da ração influencia a perda: a ração que afunda, por ter maior superfície em contato com a água, perde mais que a ração que permanece na superfície; v) a forma de incorporação afeta a lixiviação: no método de recobrimento a perda é mais significativa. Em média, 17,2% da oxitetraciclina presente na ração medicada foi perdida para água nos primeiros 5 minutos, 20,1% no decorrer de 10 minutos; 22% em 15 minutos e 29,1% decorridos 25 minutos.

Nos estudos realizados por Rigos e colaboradores (1999) a perda por lixiviação da oxitetraciclina, usando óleo de peixe como veículo, foi maior que a observada por Xu e colaboradores (1994). Em temperatura de 16 °C, aproximadamente 42% de oxitetraciclina foi perdida para a água em 3 minutos. O comportamento da

ração medicada com ácido oxolínico teve a mesma magnitude: nas mesmas condições de tempo e temperatura a redução foi de 55%.

Outro grupo de pesquisadores avaliou a influência de dois veículos diferentes (óleo de fígado de bacalhau e solução de alginato de cálcio) utilizados na dispersão de quatro fármacos (oxitetraciclina, ácido oxolínico, amoxicilina, e trimetropim/sulfametoxazol), sob a lixiviação ocorrida em 30 segundos, 3 e 30 minutos em água de temperatura de 12 °C. Nessas condições, a perda de oxitetraciclina aspergida com veículo oleoso foi de aproximadamente 8,3% (30 segundos), 19,8% (3 minutos) e 67,3% (30 minutos), apresentando-se significativamente menor quando veiculada com a solução aquosa: 1%, 2,5% e 6,3% respectivamente. Esta tendência se manteve para os demais antimicrobianos avaliados: amoxicilina (6,6%, 16,4% e 41,6% em óleo e 2,5%, 6,3% e 17,6% em solução de alginato de cálcio); trimetropim/sulfametoxazol (8,3%, 19,8% e 67,3% em óleo e 1%, 2,5% e 6,3%, em solução de alginato de cálcio) e ácido oxolínico (0%, 0,5% e 8,4% em óleo, não tendo lixiviado na presença de solução de alginato de cálcio) (DUIS et al., 1995).

A influência do veículo usado na incorporação de antimicrobianos (sulfametazina e ormetoprim) na lixiviação também foi avaliada em um estudo mais recente por pesquisadores brasileiros. Nesse caso foi comparado o método de incorporação tradicional, usando veículo a base de óleo vegetal com uma solução polimérica de etilcelulose. Em temperatura de 26 °C, a perda de sulfametazina revestida com óleo variou de 1 a 2% nos diferentes tempos avaliados (5, 15 e 30 minutos), enquanto que a veiculada com a solução polimérica a perda apresentou-se maior no decorrer do tempo, variando de 1% a 12%. O comportamento do ormetoprim mostrou-se inverso, sendo a perda maior quando veiculado ao óleo, variando de 9% a 22% e menor na solução polimérica, 1% a 10% (FAIS et al., 2017).

Diante da dificuldade de coletar material de excreta dos peixes, estudos que quantifiquem a quantidade de antimicrobiano não absorvido pelo animal e/ou excretado sem ser metabolizado são escassos na literatura. Por outro lado, estudos de biodisponibilidade que determinam a concentração do fármaco que atinge a circulação sistêmica após a absorção estão disponíveis para diversas espécies (MARTINSERP et al., 1993; PARK; LIM; YUN, 2006; SAMUELSEN; BERGH; ERVIK, 2003). A quantificação da porção do fármaco não ingerida pelo animal pode ser realizada através de um estudo de digestibilidade aparente (ADC), em que as possíveis perdas de material excretado são corrigidas pela adição de um marcador inerte (método indireto). A grande



vantagem deste método é que podemos estimar a porção de fármaco absorvido e, ao mesmo tempo, entender a interação do medicamento com a absorção de nutrientes da dieta.

A energia necessária para o desenvolvimento e crescimento é proveniente dos nutrientes ingeridos pelo animal (HAIDAR et al., 2016). Na produção de tilápia, o custo relacionado à alimentação pode representar 45 a 85% da produção (NG; HANIM, 2007), nos quais os aminoácidos são a porção mais cara da dieta (NG; ROMANO, 2013). Aproximadamente 65 a 75% da massa do peixe é composta por proteínas (GERMAN, 2011) que, juntamente com os lipídios, são os macronutrientes mais importantes para a formação de tecidos corporais (CYRINO et al., 2010). Ou seja, entender o comportamento da absorção dos nutrientes da ração medicada é de extrema importância. Porém, poucos estudos usaram a metodologia ADC para quantificar a quantidade de drogas excretadas inalteradas nas fezes e a influência do medicamento na absorção de nutrientes.

Rigos e colaboradores (1999) determinaram o coeficiente de digestibilidade de rações medicadas com oxitetraciclina e ácido oxolínico em badejo, nas temperaturas de 16 °C e 24 °C. Os resultados demonstraram que, para essa espécie, o ácido oxolínico é mais bem absorvido que a oxitetraciclina e ambos foram altamente absorvidos na temperatura mais alta. Porém, quando os animais foram aclimatados a 16 °C, mais de um terço dos antimicrobianos foi encontrado nas fezes.

Se por um lado os estudos que avaliaram o impacto dos antimicrobianos oriundos da aquicultura no meio aquático são reduzidos, por outro, os que quantificam sua presença em águas marinhas, fluviais, lençóis freáticos e água potável, estão amplamente difundidos. Contudo, devemos ressaltar que a aquicultura não é a única fonte de inserção de antimicrobianos no meio aquático. Eles podem ser provenientes dos esgotos domésticos e hospitalares, de resíduos industriais e do escoamento do solo contaminado pela medicina veterinária e agricultura, que por vezes faz uso de fezes como fertilizantes naturais (FERREIRA et al., 2007; KÜMMERER, 2009; SANTOS et al., 2010). Sua presença é percebida em todo o mundo.

Nos países asiáticos, o quadro é alarmante. Em lagoas e canais de produção de camarão no Vietnã, foi possível detectar, em grande quantidade, quatro dos antimicrobianos mais usados na carcinicultura local: norfloxacin (6000 µg L<sup>-1</sup>), sulfametoxazol (5600 µg L<sup>-1</sup>), ácido oxolínico (2500 µg L<sup>-1</sup>) e trimetropim (2000 µg L<sup>-1</sup>) (XUAN; MUNEKAGE, 2004). A contaminação em dez pontos distintos do rio

Vermelho por sulfas, trimetropim e macrolídeos foi verificada em menor escala: sulfametoxazol ( $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), sulfametazina ( $7,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) trimetropim ( $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e eritromicina ( $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (THI et al., 2011). Em Bangladesh, a análise de água doce e salobra de seis pontos próximos às pisciculturas e a criação de mariscos, em 2016 mostrou a presença de sulfametoxazol ( $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ ), sulfadiazina ( $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ ), sulfametazina ( $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ ), sulfametizol ( $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ ), trimetropim ( $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (HOSSAIN; NAKAMICHI; TANI, 2017)

A China lidera não somente a produção mundial de peixes, como também ocupa o primeiro lugar no *ranking* dos países produtores e consumidores de antimicrobianos (HE et al., 2016). Diversos estudos têm quantificado a presença de fármacos em diferentes regiões do país. No Nordeste chinês foram detectados 22 tipos de antimicrobianos nas águas do rio Haihe, sendo a maioria pertencente à classe das sulfonamidas (antimicrobianos amplamente utilizados na pecuária e aquicultura regional) e quinolonas. As maiores concentrações encontradas foram relativas ao sulfametoxazol ( $0,14 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e a norfloxacin ( $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (GAO et al., 2012). Na região central, variedade semelhante foi encontrada em águas superficiais de Jiangnan Plain e, apesar da concentração dos antimicrobianos diminuírem com o aumento da profundidade, foi possível detectar resíduos inclusive nos lençóis freáticos (YAO et al., 2015).

A abundância foi semelhante no maior rio de Shanghai, Huangpu. Nos meses de junho e dezembro de 2010 foram detectados: sulfametazina ( $0,63 \mu\text{g L}^{-1}$ ), oxitetraciclina ( $0,08 \mu\text{g L}^{-1}$ ), trimetropim ( $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ ), tianfenicol ( $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ ), sulfametoxazol ( $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ ), florfenicol ( $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ ), sulfadiazina ( $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e cloranfenicol ( $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ ). As sulfas e fenicóis foram encontradas em 100% das 19 amostras analisadas, enquanto que a tetraciclina foi encontrada aproximadamente em 90% das amostras de junho e 53% das amostras de dezembro (JIANG et al., 2011). Ao norte, no rio Wenyu e seus afluentes, a presença da oxitetraciclina também foi confirmada ( $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (ZHANG et al., 2014) e nessa mesma região, próximo às fazendas de aquicultura, nos arredores de Dalian foi detectada a situação mais grave: a presença de florfenicol na água do mar atingiu concentrações na ordem de miligrama por litro ( $11000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (ZONG et al., 2010).

Nos países europeus, embora em menor escala, a existência dos resíduos de antimicrobianos nas águas é igualmente evidenciada. No Reino Unido, um monitoramento realizado por onze meses em 2005 mostrou a presença de: lincomicina

(21,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), oxitetraciclina (4,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), sulfadiazina (4,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e trimetropim (0,02  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (BOXALL et al., 2005). Na Suíça, a análise de efluentes confirmou a presença de dois antimicrobianos bastante empregados, tanto na medicina humana quanto na veterinária: ciprofloxacina (0,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e norfloxacina (0,12  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (GOLET et al., 2001). Na Alemanha a presença de eritromicina (1,7  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), sulfametoxazol (0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) trimetropim (0,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e cloranfenicol (0,06  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foram detectadas em águas superficiais, enquanto que sulfadiazina (0,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e sulfametoxazol (0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em lençóis freáticos (HIRSCH et al., 1999; SACHER; THOMAS, 2001).

Na Espanha, antimicrobianos distribuídos em macrolídeos, sulfonamidas, quinolonas e tetraciclina foram encontrados no rio Llobregat ao longo dos últimos anos. A presença de sulfas foi predominante, com destaque para sulfametoxazol (2,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), sulfametazina (0,11  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e sulfadiazina (0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). O macrolídeo de maior destaque foi a eritromicina (0,15  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e dentre as quinolonas foram encontradas enrofloxacina (0,04  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e norfloxacina (0,02  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), além do trimetropim (0,08  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (LÓPEZ-SERNA et al., 2010; GRACIA-LOR; SANCHO; HERNÁNDEZ, 2011; CABEZA et al., 2012). Nas províncias de Castelló e Valencia foram detectados trimetropim (0,15  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), eritromicina (0,08  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), sulfametoxazol (0,03  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), ácido oxolínico (0,02  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), flumequina (0,02  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e norfloxacina (0,04  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (GRACIA-LOR; SANCHO; HERNÁNDEZ, 2011; VAZQUEZ-ROIG et al., 2012). A contaminação dos lençóis freáticos por sulfametoxazol (0,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e sulfadiazina (0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foi observada mais ao norte, na Catalunha (GARCÍA-GALÁN et al., 2010).

A avaliação de 139 regiões diferentes nos Estados Unidos mostrou a presença de trimetropim (0,71  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em aproximadamente 30% das amostras, eritromicina (1,7  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e sulfametoxazol (1,9  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em 20% e oxitetraciclina (0,34  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), sulfametazina (0,22  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e norfloxacina (0,12  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), em menor frequência (KOLPIN; FURLONG; ZAUGG, 2002). Na Costa Rica amostras de águas superficiais coletadas de 86 pontos mostraram a presença de norfloxacina (1,7  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), oxitetraciclina (0,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), sulfametazina (1,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), sulfametoxazol (0,06  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), sulfatiazol (0,04  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e trimetropim (0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (MURILLO et al., 2011).

Os resíduos de antimicrobianos gerados pela aquicultura, somados com outras fontes de contaminação, podem resultar em um desequilíbrio no ecossistema aquático, podendo provocar distúrbios endócrinos e imunossupressores em peixes, dano a microflora e a microfauna aquática além de acarretar problemas gravíssimos de saúde pública com o desenvolvimento de bactérias resistentes (FAO, 2006; LIU et al., 2012).

#### 4. Impactos dos antimicrobianos nos organismos aquáticos

A exposição a resíduos de antimicrobianos na água pode afetar funções vitais, crescimento e reprodução de diversas espécies da microflora e a microfauna local. Muitas vezes, esses organismos são fonte de alimento para outros animais do meio aquático (moluscos, peixes e crustáceos). No caso das microalgas, são os primeiros produtores da cadeia alimentar e desempenham papel de fundamental importância na produção e equilíbrio de oxigênio dissolvido (Lei et al., 2009; MARTINS; GUIMARÃES; GUILHERMINO, 2013), ou seja, exercem papel trófico significativo e dessa forma, mudanças na composição das espécies ou na biomassa resultam em respostas potenciais ao ecossistema (LIU et al., 2012).

A interferência de resíduos de antimicrobianos no crescimento de microalgas e reprodução de microcrustáceos foi corroborada por diversos autores, sendo a toxicidade dependente da espécie, do antimicrobiano, da concentração e das condições físico-químicas do meio (EGUCHI et al., 2004; YAMASHITA et al., 2006; FERREIRA et al., 2007; Lei et al., 2009; LIU et al., 2012; MARTINS; GUIMARÃES; GUILHERMINO, 2013).

A toxicidade da amoxicilina, eritromicina, levofloxacina, norfloxacina e tetraciclina em cianobactérias (*Anabaena*) e algas verdes (*Pseudokirchneriella subcapitata*) foi avaliada por Gonzalo e colaboradores (2013). De acordo com os resultados, a cianobactéria mostrou-se mais sensível que a alga, sendo a eritromicina o antimicrobiano mais tóxico para ambos os organismos, com  $EC_{50\_72h} = 0,35 \text{ mg L}^{-1}$  para alga e  $EC_{50\_72h} = 0,022 \text{ mg L}^{-1}$  para cianobactéria.

O efeito tóxico da eritromicina, sulfadimetoxina e oxitetraciclina (antimicrobianos bastante empregados na aquicultura japonesa) foi avaliado em outras espécies de algas verdes: *Selenastrum capricornutum* e *Chlorella vulgaris*. De maneira geral, a *S. capricornutum* apresentou maior sensibilidade e mais uma vez a eritromicina apresentou maior toxicidade ( $EC_{50\_72h} = 0,037 \text{ mg L}^{-1}$ ), seguida pela sulfadimetoxina ( $EC_{50\_72h} = 0,11 \text{ mg L}^{-1}$ ) e oxitetraciclina ( $EC_{50\_72h} = 0,34 \text{ mg L}^{-1}$ ) (EGUCHI et al., 2004). A resposta de microalgas (*Pseudokirchneriella subcapitata*) e microcrustáceos (*Daphnia magna*), frente à claritromicina e levofloxacina, constatou que o efeito crônico da exposição de ambos são tóxicos para *D. magna* e que a fitotoxicidade da claritromicina é dez vezes maior que a da levofloxacina, sendo necessária uma

concentração de apenas 0,0063 mg L<sup>-1</sup> para inibir o crescimento (YAMASHITA et al., 2006).

Na Dinamarca, cianobactérias de água doce *Microcystis aeruginosa*, mostraram-se bastante sensíveis aos antimicrobianos usados na aquicultura do país, principalmente a amoxicilina (EC<sub>50</sub>=0,0037 mg L<sup>-1</sup>) seguida da sulfadiazina (EC<sub>50</sub> = 0,135 mg L<sup>-1</sup>), flumequina (EC<sub>50</sub>=0,159 mg L<sup>-1</sup>), ácido oxolínico (EC<sub>50</sub> = 0,180 mg L<sup>-1</sup>) e oxitetraciclina (EC<sub>50</sub>=0,207 mg L<sup>-1</sup>) (LU AND JØRGENSEN, 1999).

Um estudo realizado em Taiwan demonstrou que os antimicrobianos da classe dos fenicóis (florfenicol, tianfenicol e cloranfenicol) interferem tanto no crescimento da alga de água doce, *Chlorella pyrenoidosa*, quanto no desempenho das algas marinhas *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chuii*, espécies amplamente utilizadas como fonte de alimento para crustáceos na fase larval. O florfenicol apresentou maior poder prejudicial, principalmente na *T. chuii* (EC<sub>50\_96h</sub> = 1,3 mg L<sup>-1</sup>) (Lei et al., 2009) e quando comparado ao efeito tóxico causado pela oxitetraciclina, é duas vezes mais eficaz em inibir o crescimento (FERREIRA et al., 2007).

Em diatomáceas marinhas, *Skeletonema costatum*, a resposta do crescimento frente à exposição ao florfenicol se mostrou dose dependente. Quando submetidos à dosagem de até 2,0 mg L<sup>-1</sup>, o crescimento destes organismos foi estimulado, enquanto que a exposição a dosagens superiores (de 2,5 mg L<sup>-1</sup> até 16 mg L<sup>-1</sup>) impediu seu desenvolvimento em até 86% (EC<sub>50\_96h</sub> = 5,04 mg L<sup>-1</sup>) (LIU et al., 2012).

O contato de *D. magna* com concentrações de florfenicol iguais ou superiores a 1,6 mg L<sup>-1</sup> afeta significativamente o crescimento somático, assim como a reprodução da espécie, com prolongamento do tempo de liberação da primeira ninhada, aumento do número de ovos abortados e redução da quantidade gerada, segundo estudo realizado por Martins e colaboradores (2013). Sendo a toxicidade crônica influenciada pela variação de temperatura, a 25 °C o antimicrobiano se mostrou mais tóxico para a espécie que a 20 °C.

O mecanismo responsável pela inibição do crescimento de algas pelos fenicóis é análogo a sua característica bacteriostática. Da mesma forma que as moléculas do fármaco interagem com a subunidade do ribossomo bacteriano, interferindo na síntese proteica, elas também podem se ligar ao ribossomo do cloroplasto, prejudicando a fotossíntese e aumentando os danos oxidativos (LIU et al., 2012). Em microcrustáceos os efeitos deletérios também estão relacionados com a

redução da síntese proteica, somado ao dispêndio de energia necessário para reparar os danos induzidos pelo estresse químico, que poderia ser usado no crescimento e reprodução da espécie (MARTINS; GUIMARÃES; GUILHERMINO, 2013).

Embora muitas vezes a concentração necessária para causar danos nesses organismos seja inferior à detectada no ambiente aquático, tais efeitos foram avaliados de forma isolada e em escala laboratorial, eliminando possíveis variações ambientais. No ambiente dispomos de uma miscelânea de compostos que muitas vezes possuem mecanismo de ação semelhante, podendo desencadear um efeito somatório ou sinérgico na toxicidade. O efeito tóxico em *P. subcapitata* da levofloxacina, quando associada à tetraciclina, é aproximadamente 26 vezes maior que o isolado. O comportamento se repete na associação com norfloxacina (8 vezes) e eritromicina (6 vezes). A toxicidade da eritromicina, por sua vez, quando associada à tetraciclina é potencializada em 12 vezes (GONZALO et al., 2013). O mesmo comportamento é observado em *S. capricornutum*, ao combinar sulfas e trimetopim (EGUCHI et al., 2004). Somados ao desequilíbrio no ecossistema aquático, gerado pela presença de resíduos de antimicrobianos, estão os problemas provocados pelo desenvolvimento de resistência bacteriana.

## 5. Resistência bacteriana

A resistência bacteriana é a capacidade do microrganismo de se adaptar às variações do meio onde está inserido, garantindo sua sobrevivência e multiplicação em condições desfavoráveis. Esses mecanismos desenvolvidos podem ser característicos da espécie, ou seja, antimicrobianos de uma determinada classe não exerce efeito sobre todas as bactérias de um determinado gênero, ou podem ser adquiridos, quando uma espécie é suscetível a um antimicrobiano, porém algumas estirpes apresentam resistência (GULLBERG et.al., 2011; PRUDENT, 2014; SERRANO, 2005). Essas adaptações podem ser favorecidas pela exposição à subdosagens terapêuticas de antimicrobianos, tornando as espécies resistentes ao fármaco. Na aquicultura, esse contato é evidenciado na aplicação de medicamentos com finalidade profilática e na lixiviação do medicamento presente na ração e/ou nas fezes para água (DONE; VENKATESAN; HALDEN, 2015).

Diversos são os mecanismos que conferem resistência às diferentes classes de antimicrobianos utilizados na aquicultura. As principais vias de resistência

adquiridas por bactérias a antimicrobianos da classe das quinolonas é resultado de mutações cromossômicas na enzima topoisomerase IV (sítio de ação do fármaco) e na redução da concentração do antimicrobiano dentro da célula, pelo aumento da atividade da bomba de efluxo. A resistência às tetraciclínas dispõe de mecanismos de proteção ribossômica (sítio de ação do fármaco) e pelo aumento da atividade da bomba de efluxo. A referente ao cloranfenicol é consequência da transmissão de genes codificadores da enzima cloranfenicol acetiltransferase, responsável por impedir a ligação do medicamento ao sítio de ação e pela presença do gene *floR*, responsável por codificar proteínas de efluxo. No florfenicol, análogo sintético do cloranfenicol, a substituição do grupo hidroxila por um átomo de flúor protege a estrutura contra a inativação enzimática, sendo a resistência decorrente de transportadores específico e não específico, RNA metiltransferase e hidrolases específicas. Além do gene *floR*, o gene *flexA* codifica proteínas de efluxo. Vários estudos reportam a presença do gene *floR* na piscicultura (BOLTON et al., 1999; MIRANDA; TELLO; KEEN, 2013; ARCANGIOLI et al., 1999).

Os genes de resistência adquiridos podem ser transferidos a outras bactérias (transferência horizontal de genes), sendo facilitada por mecanismos de transdução (mediada por vírus), transformação (fragmentos de DNA extracelular de células mortas, absorvidos pelas bactérias) e conjugação (por elementos genéticos móveis como plasmídeos) (SERRANO, 2005; STOLL et al., 2012; PRUDENT, 2014). O ambiente aquático é muito favorável a essas transmissões, funcionando como um reservatório de genes resistentes, fator bastante preocupante uma vez que a transferência de genes ocorre não somente entre as bactérias presentes em um mesmo ecossistema. Ela transcende nichos, ou seja, o uso indiscriminado de antimicrobianos na aquicultura afeta não só as espécies produzidas nos locais de criação onde o tratamento é realizado, mas também peixes em seu habitat natural (pela extrapolação das bactérias super-resistentes do reservatório de criação) e até mesmo os seres humanos (FAO, 2006; CABELLO, 2006; KUMMERER, 2009; HEUER et al., 2009).

Diversos pesquisadores relataram a presença de bactérias resistentes no ambiente aquático, associada ou não a aquicultura. Stoll e colaboradores (2012) avaliaram a prevalência de genes bacterianos resistentes a oito classes de antimicrobianos ( $\beta$  lactâmicos, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, fenicóis, tetraciclina, macrolídeos, trimetropim e sulfonamidas) em água superficiais da Áustria e Alemanha. As amostras foram coletadas em três rios diferentes e seus afluentes. Os resultados

demonstraram que 77 a 100% das amostras analisadas apresentavam genes responsáveis pela codificação de resistência bacteriana a sulfonamida e trimetropim, 64% das amostras da Áustria apresentaram o gene que confere resistência ao cloranfenicol e 36% aos  $\beta$  lactâmicos.

Outro grupo de pesquisadores australianos avaliou a resistência de 104 isolados (retirados de peixes e crustáceos provenientes da aquicultura continental e marinha) pertencentes a nove diferentes gêneros de bactérias a diversos antimicrobianos de interesse tanto para saúde humana, quanto para aquicultura. Todas as bactérias apresentaram resistência a, pelo menos, um dos 19 tipos distintos de antimicrobiano investigado, 19% foram resistentes a oxitetraciclina, 9% ao florfenicol e 9% ao ácido oxolínico (AKINBOWALE; PENG; BARTON, 2007).

Na Espanha, Ozaktas e colaboradores (2012) testaram a resistência de 12 gêneros bacterianos diferentes, isolados do muco superficial da pele de peixes do lago Mogan, a ampicilina, estreptomicina, canamicina e cloranfenicol, verificando que 95% destes gêneros apresentaram resistência à ampicilina, 93% ao cloranfenicol e 88% à canamicina e à estreptomicina.

Resistência bacteriana a diferentes antimicrobianos também foi relatada na América Latina. No Chile, a infecção causada pela bactéria *Flavobacterium psychrophilum* gera grandes perdas econômicas desde 1993, porém com o auxílio de antimicrobianos como oxitetraciclina e, mais recentemente, o florfenicol, os surtos foram controlados. Porém, o uso abusivo resultou no desenvolvimento de genes resistentes (HENRÍQUEZ-NÚÑEZ et al., 2012). O mesmo se nota no controle de infecção causada por *Piscirickettsia salmonis*, patógeno de grande relevância econômica (BRAVO, 2012).

Ao avaliar a resistência bacteriana de 40 isolados de *F. psychrophilum* provenientes de fazendas chilenas de salmão, pesquisadores relataram que 92,5% dos isolados apresentaram resistência ao florfenicol, 90% a oxitetraciclina e 85% ao ácido oxolínico (HENRÍQUEZ-NÚÑEZ et al., 2012). No início da criação de salmão os surtos por *P. salmonis* aconteciam somente duas vezes durante todo ciclo de produção. Porém, desde 2005 alguns produtores relataram o aparecimento de seis surtos por ciclo de criação. Isso é um indicador do desenvolvimento de resistência bacteriana. A dosagem de fármaco que antes funcionava para eliminar a infecção passa a não ser suficiente (BRAVO, 2012). A elevada prevalência de bactérias resistentes à furazolidona, eritromicina, oxitetraciclina, florfenicol e ácido oxolínico têm sido



reforçada por outros pesquisadores (MALDONADO et al., 2012; MIRANDA; ROJAS, 2007).

A partir do momento que os microrganismos não respondem da mesma maneira as dosagens recomendadas pelos fabricantes, os produtores muitas vezes alteram a posologia por conta própria, favorecendo ainda mais o desenvolvimento e seleção de estirpes resistentes. A dosagem de benzoato de emamectina (quimioterápico usado para controle de *Caligus rogercresseyi*) na criação de truta e salmão no Chile é de  $50\mu\text{g kg}^{-1}$  de peixe/dia durante sete dias. No entanto, alguns produtores chilenos, ao observar que tal dosagem já não era suficiente para controlar o problema dobraram a concentração e aumentaram o tempo de tratamento para 10 dias (BRAVO, 2012). Em situação antagônica, o produtor interrompe a aplicação do medicamento quando os sinais clínicos desaparecem (BRAVO, 2012; ZARZA, 2012).

## 6. Considerações finais

O emprego correto dos medicamentos é fundamental para minimizar a ocorrência do desenvolvimento de resistência bacteriana, assim como colaborar na redução dos impactos ambientais gerados pela aquicultura. Dessa forma, entender o comportamento do fármaco no animal e suas perdas durante todo o processo de criação, é de suma importância. Pois através deste conhecimento, podemos fornecer subsídios aos piscicultores quanto ao uso adequado e responsável de ração medicada.

## Referências Bibliográficas

- ADILSON, E. et al. UPLC-MS/MS determination of florfenicol and florfenicol amine antimicrobial residues in tilapia muscle. *Journal of Chromatography B*, v. 1035, p. 8–15, 2016.
- AKINBOWALE, O. L.; PENG, H.; BARTON, M. D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology**. v. 100, p. 1103–1113, 2007.
- ALDAY-SANZ, V.; CORSIN, F.; IRDE, E.; BONDAD-REANTASO, M. G. Survey on the use of veterinary medicines in aquaculture. Retirado de FAO (Food and Agriculture Organization) Improving biosecurity through prudent and responsible

- use of veterinary medicines in aquatic food production. p. 29-44, 2012.
- ARCANGIOLI, M. A; LEROY-SÉTRIN, S.; MARTEL, J. L.; CHASLUS-DANCLA, E. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. **FEMS Microbiology Letters**. v. 174, 1999.
- BOLTON, L. F. et al. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* Serotype *typhimurium* DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, n. 5, p. 1348–1351, 1999.
- BOXALL, A.B.A.; FOGG, L.A.; BAIRD, D.J.; LEWIS, C.; TELFER, T.C.; KOLPIN, D.; RAVELL, A. Targeted monitoring study for veterinary medicines in the UK environment. Final Report to the UK Environmental Agency. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, p. 1348-1351, 2005.
- BRAVO, S. Environmental impacts and management of veterinary medicines in aquaculture: the case of salmon aquaculture in Chile. Retirado de FAO (Food and Agriculture Organization). Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. p. 11-24, 2012.
- BURRIDGE, L. et al. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**. v. 306, n. 1–4, p. 7–23, 2010.
- 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, 2006.
- CABEZA, Y. et al. Monitoring the occurrence of emerging contaminants in treated wastewater and groundwater between 2008 and 2010. The Baix Llobregat (Barcelona , Spain). **Journal of Hazardous Materials**. v. 240, p. 32–39, 2012.
- CHRISTENSEN, A. M.; INGERSLEV, F.; BAUN, A. Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 25, n. 8, p. 2208–2215, 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.
- DIANA, J. S. Aquaculture production and biodiversity conservation. **Bioscience**. v. 59, p. 27 -38, 2009.

- DONE, H. Y.; VENKATESAN, A. K.; HALDEN, R. U. Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture? **The AAPS Journal**. v. 17, n. 3, p. 513-524, 2015.
- DUIS, K. et al. Leaching of four different antibacterial from oil and alginate coated fish feed pellets. **Aquaculture Research**. v. 26, p.549-559, 1995.
- EGUCHI, K. et al. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. **Chemosphere**. v. 57, p. 1733–1738, 2004.
- FAIS, A. P. et al. LC-MS/MS methods for sulfadimethoxine and ormetoprim analysis in feed and fish fillet and a leaching study for feed after alternative procedures for the incorporation of drugs. **Food Additives & Contaminants: Part A**. v. 34, n° 4, p. 501–508, 2017.
- FAO 2006 (Food and Agriculture Organization). Updating principles and methods of risk assessment. Rome, 2006.
- FAO 2012 (Food and Agriculture Organization). The state of world fisheries and aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 2012.
- FAO 2014 (Food and Agriculture Organization). Food and Nutrition in numbers. Rome, 2014.
- FAO 2016 (Food and Agriculture Organization). The state of world fisheries and aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 2016.
- FDA (Food and drug Administration), 2004. Environmental Assessment for Aquaflo® 50% Type A Medicated Article for *Catfish*. Disponível em: <<https://animaldrugstfda.fda.gov/adafda/app/search/public/document/downloadEA/110>>. Acesso em abril de 2018.
- FDA (Food and drug Administration), 2015. Freedom of information summary, supplemental new animal drug application. NADA 141-256 AQUAFLO
- FENG, J.; HUANG R.; LIU, P.; DONG, D. Pharmacokinetics of florfenicol and behavior of its metabolite florfenicol amine in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) after oral dose administration. **Journal of fish diseases**. v. 39, p. 833- 843, 2016.
- FENG, J.; JIA, X. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) held in freshwater at 22 °C. **Aquaculture**. v. 289, n. 1–2, p. 129–133, 2009.
- FENG, J.; JIA, X; LI, L. Tissue distribution and elimination of florfenicol in tilapia

- (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) after a single oral administration in freshwater and seawater at 28 °C. **Aquaculture**. v. 276, p. 29-35, 2008.
- FERREIRA, C. S. G.; NUNES, B. A.; ENRIQUES-ALMEIDA, J. M. M.; GUILHERMINO, L. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 67, p. 452-458, 2007.
- GAIKOWSKI, M. P. et al. Depletion of florfenicol amine, marker residue of florfenicol, from the edible fillet of tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. niloticus* and *O. niloticus* x *O. aureus*) following florfenicol administration in feed. **Aquaculture**. v. 301, n. 1-4, p. 1-6, 2010.
- GAO, L. et al. Occurrence, distribution and bioaccumulation of antibiotics in the Haihe. **Journal of Environmental Monitoring**. v. 14, p. 1248-1255, 2012.
- GARCÍA-GALÁN, M. J. et al. Simultaneous occurrence of nitrates and sulfonamide antibiotics in two ground water bodies of Catalonia (Spain). **Journal of Hydrology**. v. 383, n. 1-2, p. 93-101, 2010.
- GERMAN, D. P. **Food acquisition and digestion | Digestive Efficiency**. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 3
- GOLET, E. M. et al. Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical Chemistry**. v. 73, n. 15, p. 3632-3638, 2001.
- GONZALO, S. et al. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. **Water Research**. v. 7 p. 2050-2064, 2013.
- GRACIA-LOR, E.; SANCHO, J. V.; HERNÁNDEZ, F. Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1218, p. 2264-2275, 2011.
- GULLBERG, E.; CAO, S.; BERG, O.G.; IIBACK, C.; SANDEGREN, L.; HUGHES, D.; ANDERSSON, D. I. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentration. **Plos Pathogens**. v. 7, p. 1-9, 2011.
- H Aidar, M. N. et al. The effect of type of carbohydrate (starch vs. nonstarch polysaccharides) on nutrients digestibility, energy retention and maintenance requirements in Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 463, p. 241-247, 2016.
- HAYES, J. Determination of florfenicol in fish feeds at high inclusion rates by HPLC-

- UV. **Journal of AOAC International**. v. 96, p. 1-7, 2013.
- HE, S.; ZHOU, Z.; LIU, Y. Do dietary betaine and the antibiotic florfenicol influence the intestinal autochthonous bacterial community in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ x *O. aureus* ♂)? **World Journal of Microbiology Biotechnology**. v. 28, p. 785–791, 2012.
- HE, Z. et al. Pharmaceuticals pollution of aquaculture and its management in China. **Journal of Molecular Liquids**. v. 223, p. 781–789, 2016.
- HENRÍQUEZ-NÚÑEZ, H. et al. Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. **Aquaculture**. v. 354–355, p. 38–44, 2012.
- HEUER, O. E. et al. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. **Food Safety**. v. 49, p. 11–16, 2009.
- HIRSCH, R. et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of The Total Environment**. v.225, p. 109–118, 1999.
- HOSSAIN, A.; NAKAMICHI, S.; TANI, K. Occurrence, distribution, ecological and resistance risks of antibiotics in surface water of finfish and shell fish aquaculture in Bangladesh. **Chemosphere**. v. 188, p. 329–336, 2017.
- IBGE, 2015. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa\\_resultados.php?id\\_pesquisa=21](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=21)>. Acesso em abril de 2018.
- JIANG, L. et al. Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu. **Chemosphere**. v. 82, n. 6, p. 822–828, 2011.
- KOLPIN, D.; FURLONG, E.; ZAUGG, S. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U. S. streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. **Environmental Science and Technology**. v. 36, p. 1999–2000, 2002.
- KOWALSKI, P.; KONIECZNA, L.; CHMIELEWSKA, A.; OLEDZKA, I.; PLENIS, A.; BIENIECKI, M.; LAMPARCZYK, H. Comparative evaluation between capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the analysis of florfenicol in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 39, p. 983- 989, 2005.
- KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**. v. 75, p. 417- 434, 2009.

- LAI, H.; HOU, J., SU, C.; CHEN, C. Effects of chloramphenicol , florfenicol , and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 329–334, 2009.
- LANGSTON, C.; GAUNT, P. S.; WRZESINSKI, C.; GAO, D.; ADAMS, D.; CROUCH, L.; SWEENEY, D.; ENDRIS, R. Single intravenous and oral dose pharmacokinetics of florfenicol in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of Veterinary and. Pharmacology Therapy**. v. 35, p. 503- 507, 2011.
- LEWBART, G. A.; PAPICH, M. G.; WHITT- SMITH, D. Pharmacokinetics of florfenicol in the red pacu (*Piaractus brachypomus*) after single dose intramuscular administration. **Journal of Veterinary and. Pharmacology Therapy**. v. 28, p. 317- 319, 2005.
- LI, K. et al. Management measures to control diseases reported by tilapia (*Oreochromis spp.*) and whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmers in Guangdong, China. **Aquaculture**. v. 457, p. 91–99, 2016.
- LILLEHAUG, A.; LUNESTAD, B. T.; GRAVE, K. Epidemiology of bacterial diseases in Norwegian aquaculture-a description based on antibiotic prescription data for the ten-year period 1991 to 2000. **Disease of Aquatic Organisms**. v. 53, p. 115–125, 2003.
- LIM, J. et al. Plasma and tissue depletion of florfenicol in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration. **Aquaculture**. v. 307, n. 1–2, p. 71–74, 2010.
- LIU, W. et al. Plant Physiology and Biochemistry Impacts of florfenicol on marine diatom *Skeletonema costatum* through photosynthesis inhibition and oxidative damages. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 60, p. 165–170, 2012.
- LIU, X.; CALEB, J.; MENG, X. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: A review. **Environmental Pollution**. v. 223, p. 161–169, 2017.
- LÓPEZ-SERNA, R. et al. Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction – liquid chromatography-electrospray – tandem mass spectrometry. **Talanta**. v. 83, p. 410–424, 2010.
- LU, H. H.; JØRGENSEN, S.E. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 36, p.1–6, 1999.

- MALDONADO, M. A. et al. Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. **PLoS ONE**. v. 7, n. 8, p. 26–28, 2012.
- MARTINEZ-PORCHAS, M.; MARTINEZ-CORDOVA, L. R. World aquaculture: environmental impacts and troubleshooting alternatives. **The scientific World Journal**. v. 2012, p. 1-9, 2012.
- MARTINS, A.; GUIMARÃES, L.; GUILHERMINO, L. Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to *Daphnia magna* assessed at two temperatures. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.36, p. 1022–1032, 2013.
- MARTINSERP, B. et al. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater at 11 °C. **Aquaculture**. v. 112, p. 1-11, 1993.
- MICHAEL, C.; KEROUAULT, B.; MARTIN, C. Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. v. 95, p. 1008-1015, 2003.
- MIRANDA, C. D.; ROJAS, R. Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage. **Aquaculture**. v. 266, p. 39–46, 2007.
- MIRANDA, C. D.; TELLO, A.; KEEN, P. L. Mechanisms of antimicrobial resistance in finfish aquaculture environments. **Frontiers in Microbiology**. v. 4, p. 2001–2006, 2013.
- MO, W. Y. et al. Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks. **Environmental Science Pollution Research**. v. 24, p. 8978–8989, 2017.
- MPA (Ministério da Pesca e Aquicultura). Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Brasil 2010.
- MSANGI, S. et al.. Fish to 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture. World Bank Report 83177-GLB. Washington, DC: World Bank, 2013.
- MURILLO, M. et al. Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface waters. **Water Research**. v. 5, p. 6709-6717, 2011.
- NAYLOR, R. L.; GOLDBURG, R. J.; PRIMAVERA, J. H.; KAUTSKY, N.; BEVERIDGE, M. C. M.; CLAY, J.; FOLK, C.; LUCHENCO, J.; MOONEY, H.; TROELL, M. Effect of aquaculture on world fish supplies. **Nature**. v. 405, p. 1017- 1024, 2000.
- NG, W. K.; HANIM, R. Performance of genetically improved Nile tilapia compared

- with red hybrid tilapia fed diets containing two protein levels. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 9, p. 965–972, 2007.
- NG, W. K.; ROMANO, N. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, n. 4, p. 220–254, 2013.
- NIPH, 2017. Norwegian Institute of Public Health. Increased use of medicines in Norwegian fish farming. Disponível em <<https://www.fhi.no/en/hn/drug/fisk/increased-use-of-medicines-in-norwe/>>. Acessado em: janeiro 2018.
- 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.
- ONU (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS). Los pequeños estanques\_ grandes integradores de La producción agropecuaria y la cria de peces. Roma, 2000.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. Aquicultura no Brasil, o desafio é crescer. 276p. Edição: Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca, Brasília, 2008.
- OZAKTAS, T.; TASKIN, B.; GOZEN, A. G. High level multiple antibiotic resistance among fish surface associated bacterial populations in non-aquaculture fresh at environment. **Water research**. v. 46, p. 6382-6390, 2012.
- PARK, B.; LIM, J.; YUN, H. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in the Korean catfish (*Silurus asotus*). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 29, p. 37–40, 2006.
- POULIQUEN, H. et al. Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water, freshwater and seawater under abiotic conditions. **Aquaculture**. v. 262, p. 23–28, 2007.
- PRUDENT, A. Balancing water sustainability and public health goals in the face of growing concerns about antibiotic resistance. **Environment Science Technology**. v.48, p. 5-14, 2014.
- RICO, A.; PHU, T. M.; SATAPORNVANIT, K.; SHAHABUDDIN, A. M.; HENRIKSSON, P. J. G.; MURRAY, F. J.; DALSGAARD, A.; BRINK, P. J. V. Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics is four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. **Aquaculture**. v. 412-



- 413, p. 231-243, 2013.
- RICO, A.; SATAPORNVANIT, K.; HAQUE, M. M.; MIN, M.; NGUYEN, T. N.; TELFER, T. C.; BRINK, P. J. V. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risk: a critical review. **Aquaculture**. v. 4, p.735-93, 2012.
- RIGOS, G.; ALEXIS, M.; NENGAS, I. Leaching, palatability and digestibility of oxytetracycline and oxolinic acid included in diets fed to sea bass *Dicentrarchus labrax* L. **Aquaculture Research**. v.30, p. 841-847, 1999.
- SACHER, F.; THOMAS, F. Pharmaceuticals in groundwaters analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wuerttemberg, Germany. **Journal of Chromatography A**. v. 938, p. 199–210, 2001.
- SAMUELSEN, O. B.; BERGH, Ø.; ERVIK, A. Pharmacokinetics of florfenicol in cod *Gadus morhua* and in vitro antibacterial activity against *Vibrio anguillarum*. **Revista** v. 56, p. 127–133, 2003.
- SANTOS, L. H. M. L. M. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**. v. 175, p. 45–95, 2010.
- SAPKOTA, A.; SAPKOTA, A. R.; MUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER, P.; LAWRENCE, R. Aquaculture practices and potential human health risk: current knowledge and future priorities. **Environment International**. v. 34, p. 1215-1226, 2008.
- SCHERING- PLOUGH ANIMAL HEALTH AQUACULTURE, Technical bulletin Aquaflor. Disponível em: <[http://aqua.merck-animal-health.com/binaries/PDF\\_200610\\_tech\\_bulletin\\_tcm56-34712.pdf](http://aqua.merck-animal-health.com/binaries/PDF_200610_tech_bulletin_tcm56-34712.pdf)> Acesso em abril de 2018.
- SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 28, p. 519- 542, 2004.
- SENHORINI, A.; FORESTI, F. Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. **Reviews in Aquaculture**. v.4, p. 108–118, 2012.
- SERNAPESCA, 2017. Servicio Nacional de Pesca y acuicultura. Gobierno del Chile Fiscalización en pesca y acuicultura\_ Informe de actividades del año 2016. Disponível em:

- <[http://www.sernapesca.cl/presentaciones/DN/SERNAPESCA\\_IFPA\\_2016.pdf](http://www.sernapesca.cl/presentaciones/DN/SERNAPESCA_IFPA_2016.pdf)>.  
Acesso em: janeiro, 2018.
- SERRANO, P. H. Responsible use of antibiotics in aquaculture. Fisheries Technical Paper 469, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, 2005.
- SHAO, Z. J. Aquaculture pharmaceuticals and biological: current perspectives and future possibilities. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 50, p. 229-243, 2001.
- SINDAN, 2017. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal \_ Compêndio de Produtos veterinários. Disponível em: <<http://www.cpv.com.br/cpv>>. Acesso em abril de 2018.
- SOTO, E.; ENDRIS, R. G.; HAWKE, J. P. *In vitro* and *in vivo* efficacy of florfenicol for treatment of *Francisella asiatica* infection in Tilapia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 54, p. 4664-4670, 2010.
- STOLL, C.; SIDHU, J. P. S.; TIEHM, A.; TOZE, S. Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water sample collected from Germany and Australia. **Environment Science Technology**. v.46, p. 9716-9726, 2012.
- SUN, Y. et al. Fate of florfenicol in a simulated aquatic ecosystem and effects on sediment microflora. **Water Environmental Research**. v. 84, p. 1–6, 2010.
- THI, P. et al. Science of the Total Environment Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. **Science of the Total Environment**. v. 409, n. 15, p. 2894–2901, 2011.
- TUŠEVLJAK, N.; RAJIĆ, A.; UHLAND, L.; REID-SMITH, R.; MCEWEN, S. Antimicrobial use and resistance in selected zoonotic bacteria in aquaculture: preliminary findings of a survey of aquaculture- allied professionals. Retirado de FAO (Food and Agriculture Organization) Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. p. 45-50, 2012.
- VALLADÃO, G., GALLANI, S., PILARSKI, F., 2016. South American fish for continental aquaculture. *Rev. Aquac* 1–19.
- VAZQUEZ-ROIG, P. et al. Science of the Total Environment Risk assessment on the presence of pharmaceuticals in sediments , soils and waters of the Pego – Oliva Marshlands (Valencia , eastern Spain). **Science of the Total Environmental**. v. 440, p. 24–32, 2012.
- XINHUA, Y.; WEN, C. Use of veterinary medicines in Chinese aquaculture: current

- status. Retirado de FAO (Food and Agriculture Organization). Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. p. 51-67, 2012.
- XU, D.; ROGERS, W. A. Leaching Loss from Oxytetracycline Medicated Feeds. **Journal of Applied Aquaculture**. v. 4, n. 1, p. 29–38, 1994.
- XUAN, T.; MUNEKAGE, Y. Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam. **Marine Pollution Bulletin**. v. 49, p. 922–929, 2004.
- YAMASHITA, N.; YASOJIMA, M.; NAKADA, N.; MIYAJIMA, K.; KOMORI, K.; SUZUKI, Y., 2006. Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms. **Water Science and Technology**. v. 53, p.65-72, 2006.
- YANG, Q.; XIE, L.; WU, Z.; CHEN, X.; YANG, Y.; LIU, J.; ZHANG, Q. Pharmacokinetics of florfenicol after oral dose administration in Yellow Catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. **Journal of the world aquaculture society**. v. 44, p. 586-592, 2013.
- YAO, L. et al. Science of the Total Environment Seasonal variation of antibiotics concentration in the aquatic environment: a case study at Jiangnan Plain, central China. **Science of the Total Environment**. v. 527–528, p. 56–64, 2015.
- 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.
- ZHANG, Q. et al. Occurrences of Three Classes of Antibiotics in a Natural River Basin: Association with Antibiotic-Resistant *Escherichia coli*. **Environmental Science and Technology**. v. 48, p. 14317-14325, 2014.
- ZONG, H.; MA, D.; WANG, J. Research on Florfenicol Residue in Coastal Area of Dalian ( Northern China ) and Analysis of Functional Diversity of the Microbial Community in Marine Sediment. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**. v.84, p. 245–249, 2010.

CAPÍTULO III  
EVALUATION OF THE LEACHING OF FLORFENICOL FROM COATED  
MEDICATED FISH FEED INTO WATER

## **Evaluation of the leaching of florfenicol from coated medicated fish feed into water**

Fabíola Málaga Barreto\*<sup>a</sup>, Mariana Rodrigues da Silva<sup>a</sup>, Patrícia Aparecida de Campos Braga<sup>a</sup>, Adriana Pavesi Arisseto Bragotto<sup>a</sup>, Hamilton Hisano<sup>b</sup>, Felix Guillermo Reyes Reyes<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Food Science, School of Food Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Rua Monteiro Lobato, 80, 13083-862, Campinas, SP, Brazil.

<sup>b</sup>Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP-340, Km 127.5, Tanquinho Velho, P.O Box 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP, Brazil.

*Authors e-mail address:* Mariana Rodriguez da Silva (*marianacotuca@gmail.com*), Patrícia Aparecida de Campos Braga (*pbraga2015@gmail.com*), Adriana Pavesi Arisseto Bragotto (*adriana.arisseto@gmail.com*), Hamilton Hisano (*hamilton.hisano@embrapa.br*), Felix Guillermo Reyes Reyes (*reyesfgr@gmail.com*)

\* Corresponding author. Phone: +55 19 981004079 (Fabíola Málaga Barreto)

*E-mail address:* *fabiolamalagabarreto@gmail.com*

**Abstract**

Florfenicol is one of the most-used antimicrobial agents in global fish farming. Nevertheless, in most countries, its use is not conducted in accordance with good practices. The aim of this work was to evaluate the leaching of florfenicol from coated fish feed into the water. Analytical methods were developed and validated for the quantitation of florfenicol in medicated feed and water by UHPLC-MS/MS. Florfenicol residues in the water were quantified after 5- and 15-min exposures of the medicated feed in the water at 22 and 28 °C and at pH 4.5 and 8.0. The influence of pellet size and three coating agents (vegetable oil, carboxymethylcellulose, and low-methoxylated pectin) on the leaching of the drug was also assessed. Pellet size, coating agent, water temperature, and time of exposure significantly ( $p < 0.05$ ) affected florfenicol leaching, while water pH did not interfere with the leaching. Coating with vegetable oil was the most efficient method to reduce florfenicol leaching, while coating with carboxymethylcellulose presented the highest leaching (approximately 60% after 15 min at 28 °C). Thus, the coating agent has a significant effect on the florfenicol leaching rate and, consequently, on the necessary dose of the drug to be administered. Moreover, it is worth mentioning that higher florfenicol leaching will pose a greater risk to environmental health, specifically in terms of the development of bacteria resistant to florfenicol. Additional studies are needed with other polymers and veterinary drugs used in medicated feed for fish farming.

**Keywords:** fish feed; florfenicol; leaching; pectin; carboxymethylcellulose.

## 1. Introduction

Commercial fish farming is predominantly based on intensive and semi-intensive systems (Bostock et al., 2010), subjecting aquatic species to stressful conditions (Leung and Bates, 2013). This scenario may increase the risk of disease outbreaks and financial losses (Eurico et al., 2010). Thus, antibiotics have been widely used in fish farming to control bacterial diseases. Among several antimicrobials, florfenicol (FF) is one of the most used in aquaculture at a global level (Norambuena et al., 2013), it acts as a bacteriostatic, preventing bacterial protein synthesis, and is effective against Gram-positive and Gram-negative bacteria (Martins et al., 2013). Mechanism of action of FF involves the inhibition of protein synthesis by binding to 70S ribosomal 50S subunits of susceptible bacteria, leading to the inhibition of peptidyl transferase and preventing the transfer of amino acids to extending peptide chains and subsequent protein formation (Liu et al., 2012). According to Hayes (2013), the use of FF is approved by the legislative framework of 25 countries, among them, the large fish aquaculture countries. Although the use of FF for treatment of diseases and as a prophylactic and growth promoter appears to be recurrent in Asia, information regarding the amount and dose is scarce (Li et al., 2016; Rico et al., 2012). On the other hand, the sale and application of FF in salmon farming is well established. In 2013, Norwegian aquaculture consumed approximately 0.3 tons of FF (Norwegian Institute of Public Health, 2013), while in Chile, consumption in the same year was almost a thousand times larger.

Furthermore, it should be mentioned that despite the high use of FF in fish farming all over the world, evaluation of its negative environmental impact due to the contamination of the environment (mainly waterbodies) is still a challenge. This is a real environmental problem considering that in most countries, mainly in Asia and Latin America, control through sale and inspection is quite flawed (Alday-Sanz et al., 2012). Moreover, due to the lack of alternative veterinary medicinal products prescribed for use in aquaculture, it has been reported that fish farmers are making use of veterinary drugs prescribed for other animal species (Rico et al., 2012) and even the use of banned substances, such as the malachite green dye (Hashimoto et al., 2011). An important issue of concern is the contribution of fish farming activity to the development of microbial antibiotic resistance, which is considered the most prominent human and environmental health risk associated with the use of antibiotics (Binh et al., 2018).

Consequently, studies are necessary to evaluate the leaching of veterinary drugs from medicated feed used in fish farming. These studies may help to achieve the required dose of a drug and to establish recommendations for responsible use to avoid or minimize drug leaching and the associated development of resistant microorganisms (Heuer et al., 2009).

In fish farming, drug oral administration is the most common method (Gonc et al., 2007). Drugs can be added with a coating technique, where the drug is mixed with a coating agent and this mixture is slowly poured onto the feed using a coating machine run at low speed. The most common coating agents for the incorporation of antibiotics in the fish feed are gelatine, vegetable oil or fish oil (Furones and Rodgers, 2009), being vegetable oil one the most used because it is cheaper and accessible. Additionally, a third alternative has become commercially available at specialized stores in the retail market, in the form of an additive binder that helps in the fixation of fish feed supplements. It is a solution composed of carboxymethylcellulose (CMC) and preservatives. However, this technique still presents problems in homogenization, palatability, and leaching of the drug into the water (Zarza, 2012). An alternative to solving the leaching problem is the development of new coating agent. Fais et al. (2017) reported that the leaching of ormetoprim is reduced, by half, when replacing the use of vegetable oil with a polymer solution of ethylcellulose. In this context, several other polymers can be tested for this purpose. Pectin is a polysaccharide widely used both in the pharmaceutical industry and in the food industry, for the property of forming film (Katsuda et al. 2008).

It is important to mention that infections on fish farms occur at different stages, causing farmers to produce medicated feed with different sizes, once pellet size varies according to the size of the species to be fed (New, 1987). According to Ranjan (2017), antibiotics leaching losses from the medicated feed can be affected by pellet size, veterinary drug polarity and how long the feed remains in the water before being consumed by the fish. Nevertheless, to our knowledge, reported studies that evaluates the leaching of FF into water from medicated fish feed prepared by the coating method are scarce. However, according to data reported by Yanong et al., 2005, leaching of FF from the medicated feed to the water, when the drug is incorporated into the diet with vegetable oil (as recommended in the label of the drug) can reach 50-80%. In this way, the search for new ways of incorporating the drug into the feed is highly desirable and polymers may be one approach. Recently, Busatto et al. (2017) described the



incorporation of albendazole in the fish feed using ethylcellulose polymer instead of vegetable oil, with lower leaching results. In this way CMC and pectin were chosen to test their efficiency in retaining FF in the feed.

Reliable analytical methods are essential to evaluate the concentration of veterinary drugs in medicated fish feed to minimize under-dosing of the drug, as well as to evaluate drug leaching and to be able to take actions to avoid or minimize negative environmental impacts through the responsible use of antibiotics in fish farming. In this context, the LC-MS technique has proved to be a powerful tool for the quantitation of FF, whatever it is in biological matrices such as fish tissues (Barreto et al., 2016; Monteiro et al., 2015; Mostafa et al., 2017; Pan et al., 2015), or in environmental samples such as sea water and sediments (González-Gaya et al., 2018) and fresh water samples (Mostafa et al., 2017). In this way analytical methods developed using this technique provide reliable results, presenting high sensitivity and selectivity, which is highly desirable in the determination of low concentrations. Nevertheless, studies regarding the leaching of veterinary drugs during fish treatment are limited, as are the analytical methods for determining FF in the feed (Fais et al., 2017; Rigos et al., 1999).

Thus, in this study, the leaching of FF into water from medicated fish feed prepared by coating was evaluated under different conditions of water temperature, water pH, pellet size, and coating agent (vegetable oil, carboxymethylcellulose, and low-methoxylated pectin). Furthermore, in order to quantify FF in medicated feed and its residues leached into water, simple and reliable analytical methods using UHPLC-MS/MS were developed and validated.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Chemicals*

The florfenicol ([R-(R\*,S\*)]-2,2-Dichloro-N-[1-(fluoromethyl)-2-hydroxy-2-[4-(methylsulfonyl)phenyl]ethyl]acetamide; CAS Number: 73231-34-2) analytical standard (purity 99%) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All of the solvents used in this study were of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade, and all of the reagents were of analytical grade. Acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were supplied by J T Baker (Phillipsburg, N J, USA). Formic acid (purity 98%), acetic acid (purity 98%) and magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>) were obtained

from Sigma-Aldrich. Dodecyl-C18 was purchased from Agilent (Santa Clara, CA, USA). Disodium phosphate, citric acid, sodium hydroxide (NaOH), and ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), and calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) was from Dinâmica (Diadema, SP, Brazil). Low methoxylation pectin (LMP) was donated by CPKelco (Limeira, SP, Brazil). The commercial veterinary medicine containing FF (Aquaflor, 50% premix) was obtained from Merck Animal Health (São Paulo, SP, Brazil). The aqueous solution of CMC was obtained from Vansil, (Descalvado, SP, Brazil). The 0.22 µm porosity polytetrafluoroethylene (PTFE) filtration membranes were purchased from Nova Analítica (São Paulo, Brazil) and used to filter sample extracts. Ultra-pure water was obtained by the passage through a reverse osmose system (Gehaka, model OS20 LX, São Paulo, SP, Brazil) and then through a Milli-Q Simplicity system (Millipore, Bedford, MA, USA).

## *2.2. Medicated feed preparation*

The coating process was chosen for the study of FF leaching behaviour from medicated feed, due the fact that it is the most common practice in fishing farming. The medicated feed was prepared using different coating agents, a 4-6 mm diameter commercial feed was used (Guabi brand, São Paulo, Brazil). The feed was coated with three different agents: vegetable oil (T1 treatment), commercial carboxymethylcellulose (CMC) product (T2 treatment), and aqueous solutions of low-methoxylated pectin (LMP) at 1.5% and 3% (T3 and T4 treatments, respectively). A food-grade corn oil from the retail market was employed, a more economical alternative than the use of fish oil; the aqueous solution of CMC was purchased from a specialized aquaculture retail store, and aqueous solutions of LMP were prepared in our laboratory using an ultra turrax (model TE102 Catel).

The medicated feed coated with oil (T1) was prepared as indicated on the veterinary medicine label for Aquaflor® 50% premix (Merck, 2015), weighing out vegetable oil (2% m/m ratio) and the premix separately and mixing both before adding to the fish feed. For the preparation of the aqueous solution of CMC (T2), the manufacturer recommendation of 2.5% (v/m ratio) was followed. The volume of LMP (T3 and T4) was optimized in preliminary tests, where the best scattering and homogenization results occurred with 10% (m/v).

The preparation of the medicated feed was carried out in a similar manner for the four treatments. The FF solution prepared for the different coating agents was homogenized and poured onto feed in a mini coating pan (Model LM-DR, Lemaq, SP, Brazil) at a slow rotation speed, for 5 min. The coated LMP feed (T3 and T4) was subjected to an additional treatment with a solution of 3% CaCl<sub>2</sub>, following by 3 min of homogenization. The medicated feeds were spread over the laboratory bench at room temperature (25 °C), left overnight to finish drying, and then analysed for FF content.

To study the behaviour of leaching as a function of feed pellet size, five sizes of commercial feed (Presence brand, São Paulo, Brazil) were used: 1.4 mm (T5), 1.9 mm (T6), 2.6 mm (T7), 3.4 mm (T8), and 4.0 mm (T9). The feeds were prepared using the same procedure as for the T1 treatment.

### *2.3. Florfenicol quantitation in medicated feed and leachate*

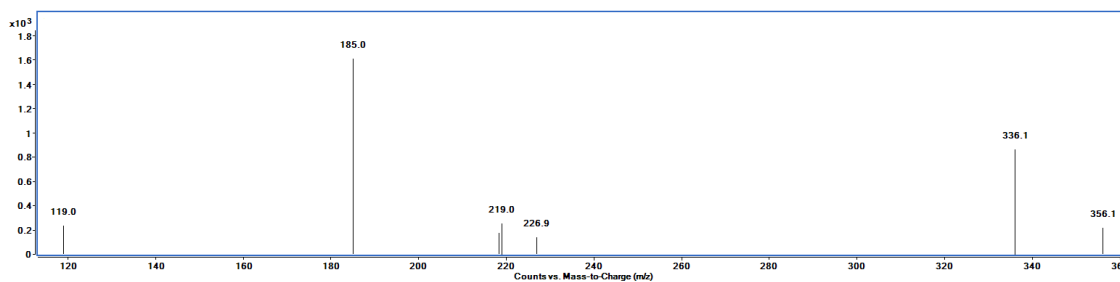
#### *2.3.1. Sample preparation*

Medicated feed (all treatments, T1 to T9) containing FF (1.0 g) was transferred to a 50 mL polypropylene tube. For feed coated with oil (T1, T5 to T9) and CMC (T2), ACN (5 mL) was added and the mixture was homogenized for 30 s in an ultraturrax (MA 102 model, Marconi, SP, Brazil), vortexed for 5 min (Genie 2 vortex model, Daigger, Bohemia, NY, USA), and centrifuged at 12,000 g for 5 min (Eppendorf centrifuge model 5810R). Afterwards, 1.0 mL of the supernatant was transferred to a 2 mL Eppendorf tube containing 150 mg MgSO<sub>4</sub> and 50 mg Dodecyl-C18. The mixture was vortexed and centrifuged (Gyrozen Mini model, Gangnam-gu, Seoul, Rep. of Korea), and the supernatant was filtered (0.22 µm), diluted 1:500 (v/v) with ACN, and injected in the UHPLC system. For the LMP coated feed (T3 and T4), in addition to ACN, an aliquot of 2.5 mL of McIlvaine buffer - EDTA solution (pH 7.4) was added.

Water samples collected after the leaching period were simply filtered (0.22 µm) and injected in the UHPLC system.

### 2.3.2. UHPLC-MS/MS conditions

For determination of FF in the feed, chromatographic separation was carried out with an SB C18 column (1.8 mm × 50 mm × 2.1 μm) (Agilent Technologies, CA, USA) using a ternary mobile phase composed of a 0.1% formic acid solution (A) and ACN:MeOH (50:50 v/v) (B) using a gradient program as follows: from 0 to 0.7 min, 70% A and 30% B; from 0.71 to 1.50 min, 10% A and 90% B; from 1.51 to 2.50 min, 90% A and 10% B; and from 2.5 to 3.00 min, return to the initial ratio for analytical column reconditioning. For quantitation of FF residues in water, a chromatographic separation previously developed for determination of FF residues and its main metabolite florfenicol amine (FFA) in tilapia muscle was applied. In this method an SB C8 column (3.0 mm × 100 mm × 1.8 μm) (Agilent Technologies, CA, USA) was employed, using a ternary mobile phase composed of a 0.1% acetic acid solution (A) and ACN:MeOH (50:50 v/v) with 0.1% acetic acid (B) in isocratic mode. For both feed and water samples, the flow was 0.6 mL min<sup>-1</sup>, the column oven temperature was 45 °C, and the injection volume was 1 μL. The analyses were performed using an UHPLC 1290 system coupled with an Agilent 6460 triple quadrupole tandem mass spectrometer, with electrospray ionization (ESI) source in negative mode (Agilent Technology, CA, USA). The source operation conditions were as follows: gas temperature, 300 °C; gas flow, 12 L min<sup>-1</sup>; nebulizer, 30 psi; sheath gas flow, 10 L min<sup>-1</sup>; sheath gas temperature, 250 °C; capillary voltage, 3.0 kV; and nozzle voltage, 1.0 kV. Sample analyses were performed in the multiple-reaction monitoring (MRM) scan mode, using a dwell time of 100 ms per channel, and the MassHunter software workstation, version B.06.00. Two transitions (daughter ions) were monitored for FF to obtain at least three identification points, as recommended by the European Community Guide 2002/657/EC (EC 2002). The FF precursor ion monitored was m/z 356, the FF molecule was quantified and identified by monitoring the transitions from m/z 356 to 336 and from m/z 356 to 185, respectively. The optimized mass spectrometric parameters were established as follows: a fragmentor voltage of 116 V, with a collision energy of 4 V for transitions from m/z 356 to 336 and 16 V for transitions from m/z 356 to 185. The produced ion spectrum was obtained, and high-intensity fragments were chosen for quantitation (Fig. 1).



**Figure 1.** Mass spectrum of florfenicol

### 2.3.3. *Validation of the analytical methods*

Method validation for the quantitation of FF in medicated feed was performed based on the Commission Decision 2002/657/EC (EC, 2002). The following analytical parameters were evaluated: selectivity, linearity, matrix effect, precision and accuracy. Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) of the method were also evaluated for both feed and water.

The chromatograms were evaluated for the presence of an analytical signal at the same retention time observed for the mass-to-charge ratio (m/z) of FF. Linearity was established by a linear regression analysis of the analytical curves obtained from the triplicated analysis of blank samples spiked with FF at seven levels of fortification ranging from 50 ng mg<sup>-1</sup> to 350 ng mg<sup>-1</sup>, with equal intervals of 50 ng mg<sup>-1</sup>. The analytical curve in water ranged from 0.5 ng mL<sup>-1</sup> to 15.0 ng mL<sup>-1</sup>.

For the feeds, matrix effects were evaluated by comparing the analytical curves for the solvent to the analytical curves for the extract from the matrixes. To assess homogeneity of variance, the Fisher-Snedecor test (F-test,  $\alpha = 0.05$ ) was applied, and Student's t-test ( $\alpha = 0.05$ ) was employed to verify the presence/absence of matrix effects. Accuracy was evaluated from recovery tests of the spiked blank matrixes at three levels (50, 200, and 350 ng mg<sup>-1</sup> for the feeds and 0.5, 7.5, and 15.0 ng mL<sup>-1</sup> for water) with six replicates at each level. Precision was determined in two steps: intra-day and inter-days precision. Intra-day precision was evaluated in three concentrations (50, 200, and 350 ng mg<sup>-1</sup> for the feeds, and 0.5, 7.5, and 15.0 ng mL<sup>-1</sup> for water) with six replicates. Inter-days precision was determined in the same manner as intra-day precision on three different days. LOD was determined by the signal-to-noise relation of

the baseline with a FF signal equal to three times the signal-to-noise ratio. The LOQ was determined as the first level of the analytical curve, which was measured with acceptable precision ( $CV \leq 20\%$ ).

#### *2.4. Leachate study experimental design*

The first leaching study was performed with the first four treatments (T1, T2, T3, and T4) to determine which of the coatings (vegetable oil, CMC, and LMP at 1.5% and 3%) was more efficient at retaining FF in the feed (5 mm). Three variables with two levels each (temperature: 22 and 28 °C; feed contact time with water: 5 and 15 min; water pH: 7.0 and 8.0) were evaluated, totalling 32 triplicate assays. These values were defined, according to average temperatures and pH in winter and summer for tilapia culture in tropical countries (Marangoni, 2006) A second study was carried out with the other treatments (T5 to T9) to evaluate the influence of feed size on FF leaching from the medicated feed using vegetable oil as the coating agent. In this study, the same variables were considered, totalling 40 triplicate assays. The assays were carried out randomly for both studies.

For the leaching experiments, 25 g of medicated feed was placed in a 2-L Erlenmeyer flask containing 500 mL of water and shaken at 80 rpm using a New Brunswick Innova 4900. Water temperature (22 and 28 °C) and pH (7.0 and 8.0) were controlled. Water pH was adjusted with NaOH (1 M) using a digital pH meter (model DM20, Digimed). Aliquots of water were collected at 5 and 15 min and stored in 50-mL polypropylene tubes at 4 °C for further analysis.

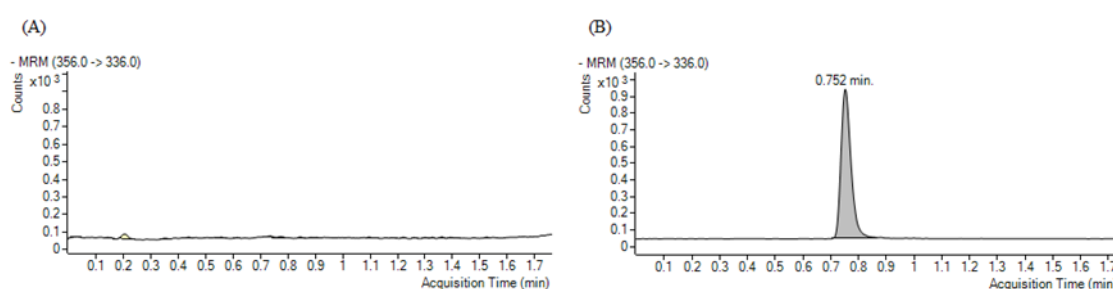
The response variable (i.e., the ratio of FF% in the water to FF% in the feed) was compared using Analysis of Variance (ANOVA). Tukey' HSD post hoc test was used for pair-wise comparisons. All statistical analyses were conducted using the statistical platform R (R Core Team, 2017).

### **3. Results**

#### *3.1. Validation of analytical methods*

For the medicated feeds, the selectivity assays demonstrated the viability of the blank samples used in the validation procedure, once no interference signals at the

retention time of the FF were observed (Fig. 2). No matrix effect was verified in any of the medicated feeds. The linear correlation coefficients ( $r$ ) of the analytical curves were higher than 0.98 for all matrixes. For all of the matrixes at all fortification levels, precision (CV%) was less than 15% and accuracy was between 80% and 110%. The LOD and LOQ of the methods (for feed and water) were  $0.2 \text{ ng mL}^{-1}$  and  $0.5 \text{ ng mL}^{-1}$ , respectively. Thus, analytical methods for determination of FF in medicated feed and FF residues in water confirmed to be in compliance with the validation guide adopted (EC, 2002) and proved to be suitable for the intended purposes.



**Figure 2.** Typical MRM chromatograms for (A) blank feed and (B) medicated feed with florfenicol added by the coating method. In this example, corn oil was the coating agent.

### 3.2. Medicated feed: coating process

The concentration of FF quantified in the feed coated with CMC was, on average, 27% lower than what was added. For the medicated feeds covered with LMP (1.5% and 3%), losses were 14% and 10%, respectively. For the medicated feed coated with oil, the loss was 7%, but this treatment had the lowest homogeneity (CV% = 27). In coating processes for T2, T3, and T4, the CV was similar, around 10%.

### 3.3. Florfenicol retention efficiency evaluation of the coating agents

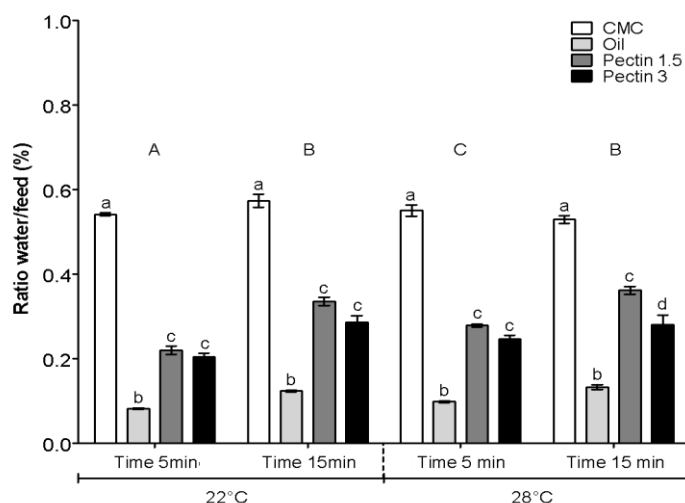
Under all tested conditions, vegetable oil was the most efficient coating agent for avoiding leaching of FF from the medicated feed, including variations in the duration of feed exposure to the water and temperature (Table 1; Fig. 3). On the other hand, CMC was the least efficient coating agent, while pectin presented an intermediate ability to

retain the drug (Table 1, Fig. 3). The results demonstrated that 5 min of feed exposure in the water presented less leaching at 22 °C than at 28 °C, while 15 min of feed exposure in the water showed similar leaching at both temperatures (Table 1; Fig. 3).

**Table 1.** Analysis of Variance (ANOVA) summarizing the effects of different coating agents (vegetable oil, carboxymethylcellulose, and pectin 1.5% and 3%) on leaching of florfenicol from feed under different conditions of water temperature (22 and 28 °C) and water exposure for different time periods (5 and 15 min).

Source of variation	df	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
Temperature	1	0.01	7.38	<b>0.008</b>
pH	1	0.01	0.05	0.821
Coating agent	3	0.80	1245.81	<b>&lt;0.001</b>
Time	1	0.06	93.70	<b>&lt;0.001</b>
Temperature vs. pH	1	0.01	4.66	<b>0.034</b>
Temperature vs. coating agent	3	0.01	5.70	<b>0.001</b>
pH vs. coating agent	3	0.01	0.35	0.783
Temperature vs. time	1	0.01	11.63	<b>0.001</b>
pH vs. time	1	0.01	3.35	0.071
Coating agent vs. time	3	0.01	14.50	<b>&lt;0.001</b>
Temperature vs. pH vs. coating agent	3	0.01	1.26	0.292
Temperature vs. pH vs. time	1	0.01	2.18	0.144
Temperature vs. coating agent vs. time	3	0.01	0.95	0.420
pH vs. coating agent vs. time	3	0.01	0.18	0.907
Temperature vs .pH vs. coating agent vs.	3	0.01	0.55	0.644
Residuals	64	0.01		





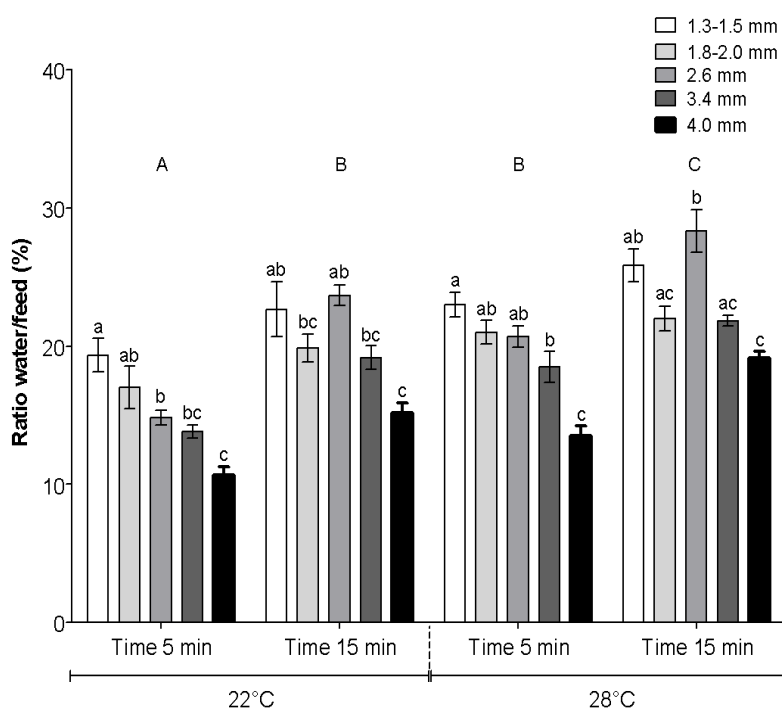
**Fig. 3.** Leaching of florfenicol under different conditions. Leaching of florfenicol from feed coated with vegetable oil (oil), carboxymethylcellulose (CMC), and pectins (1.5% and 3%) at different temperatures (22 and 28 °C) and water exposure periods (5 and 15 min). The pH did not affect leaching and is therefore not represented in this figure (ANOVA,  $F_{1,64} = 0.052$ ,  $P = 0.821$ ). Bars indicate the s.e.m.; uppercase letters indicate statistical differences among time periods at each temperature; and lowercase letters indicate statistical differences among the treatments (ANOVA/Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

### 3.4. Evaluation of pellet size effects on the leaching of florfenicol

The larger pellet size (4 mm) presented less leaching of FF under all tested conditions, while the smaller pellet sizes (i.e., 1.3-1.5 mm, 1.8-2 mm, and 2.6 mm) had higher leaching ratios (Table 2, Fig. 4). However, leaching from smaller pellets varied with temperature and time of exposure to the water. With 15 min of water contact, there was greater leaching from the pellet sizes of 1.3-1.5 mm and 2.6 mm than for pellet sizes of 1.8-2.0 mm and 3.4 mm (Fig. 4), which was apparently independent of the temperature.

**Table 2.** Analysis of Variance (ANOVA) summarizing the effects of different pellet sizes (1.3-1.5 mm, 1.8-2.0 mm, 2.6 mm, 3.4 mm, and 4.0 mm) on leaching of FF from feed under different conditions of water temperature (22 and 28 °C) and water exposure period (5 and 15 min).

Source of variation	df	MS	F	P
Temperature	1	425.6	111.3	<b>&lt;0.001</b>
pH	1	0.0	0.00	1.000
Pellet size	4	990.5	64.74	<b>&lt;0.001</b>
Time	1	616.5	161.18	<b>&lt;0.001</b>
Temperature vs. pH	1	24.3	6.35	<b>0.013</b>
Temperature vs. pellet size	4	17.5	1.15	0.341
pH vs. pellet size	4	33.2	2.16	0.080
Temperature vs. time	1	5.6	1.47	0.228
pH vs. time	1	64.5	16.87	<b>&lt;0.001</b>
Pellet size vs. time	4	138.6	9.06	<b>&lt;0.001</b>
Temperature vs. pH vs. pellet size	4	18.2	1.19	0.321
Temperature vs. pH vs time	1	24.3	6.35	<b>0.013</b>
Temperature vs. pellet size vs time	4	9.9	0.64	0.632
pH vs. pellet size vs. time	4	41.6	2.72	<b>0.053</b>
Temperature vs. pH vs. pellet size vs. time	4	99.5	6.50	<b>&lt;0.001</b>
Residuals	80	306.0		



**Figure 4.** Influence of pellet size on the leaching of florfenicol. Leaching of florfenicol from vegetable-oil-coated feed by pellet size (1.3-1.5 mm, 1.8-2.0 mm, 2.6 mm, 3.4 mm, and 4.0 mm), water temperature (22 and 28 °C), and water exposure period (5 and 15 min). The pH did not affect leaching and is therefore not represented in this figure (ANOVA:  $F_{1,80} = 0.01$ ,  $P = 1.00$ ). Bars indicate the s.e.m.; uppercase letters indicate statistical differences among time periods at each temperature; and lowercase letters indicate statistical differences among the treatments. (ANOVA/Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Studies of antibiotic leaching have shown that the release of the drug from the feed is proportional to increases in temperature and exposure time. In those studies, the drugs leached at a higher rate at higher temperatures, and the release was progressive with time. Moreover, the nutritional composition of the feed influenced the amount of leaching, as did the feed density and coating method (Duis et al., 1995; Fais et al., 2017; Rigos et al., 1999; Xu et al., 1994). In accordance with previously cited literature, this study found that FF leaching was significantly ( $p < 0.05$ ) affected by the

coating agent, water temperature, and the period of time the medicated feed was in the water, with the exception of the 15-min period, which showed no difference between the two temperatures evaluated (Table 1, Fig. 3). The different efficiencies of the three coating agents in retaining FF (vegetable oil (T1) > LMP (T3 and T4) > CMC (T2)) seem to be related to FF polarity. FF has a low solubility in water ( $1.32 \text{ g L}^{-1}$  at pH 7.0), interacting more with medium and low polarity compounds (FDA, 2004; Wang et al., 2011). Thus, it has greater affinity for the non-polar coating agent. Moreover, the gels formed by LMP are not stable in water (Paolucci et al., 2012), and polymer solutions are highly polar, with the hydrophobicity of CMC being greater than that of LMP (Walter and Talomie, 1990). However, although treatment T1 showed lower FF leaching, the distribution of the drug in the feed was less homogeneous (T1 CV = 27%, T2, T3 e T4 were similar, around 10%), suggesting that during the administration of medicated feed prepared with vegetable oil, some animals may ingest FF at a lower or higher dose than required to achieve the desired therapeutic effect.

As regards the medicated feed, in all samples analysed, the measured FF concentration was found to be lower than the nominal concentration (initially added), indicating losses during the coating process. It was verified that those losses occurred in two stages: during the mixing of FF with the coating agent, as well as during the feed coating process. In the coating process, a portion of the mixture was retained on the wall of the coating pan. Thus, FF losses observed during preparation of the medicated feed by treatments T1, T2, T3, and T4 were 7%, 27%, 14%, and 10%, respectively. Therefore, considering the sum of FF losses during the coating and leaching processes (after 5 min at  $22^{\circ}\text{C}$ ), the received dose is reduced by 14%, 70%, 31%, and 28%. Thus, instead of a dose of  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight (bw), the received dose was 8.6, 3.0, 7.0, and  $7.2 \text{ mg kg}^{-1}$  bw. Furthermore, evaluation of FF leached from feed with different pellet sizes showed that the smaller size, with greater surface area in relation to the feed volume, presented higher leaching, and the release rate decreased with increasing pellet size. Therefore, the feed with the lowest leaching was the 4 mm in diameter feed, and the feed with a size of 1.3 to 1.5 mm presented the highest leaching.

It is worth mentioning that veterinary drugs are often recommended for the treatment of infections caused by opportunistic pathogens that affect the fish mainly during the summer (Li et al., 2016; Mo et al., 2017; He et al., 2012). In Asian aquaculture, FF is applied for the treatment of furunculosis, vibriosis, and streptococcosis (Li et al., 2016; Mo et al., 2017). The Brazilian legislative framework

allows the use of FF in tilapia species and their hybrids for the treatment of illnesses caused by *Aeromonas* sp. or *Streptococcus agalactiae* (SINDAN, 2017). Outbreaks caused by *S. agalactiae* take place throughout the country, particularly at temperatures in the range of 27 to 31 °C (Mian et al., 2009). With the exception of fish that require lower temperatures (i.e., salmon and trout) (Bravo et al., 2013; Oppedal et al., 2011), for fish farmed at warm temperatures, such as tilapia and Brazilian native species (tambaqui and pacu being the most farmed), water temperature may be higher than the temperatures evaluated in this study. It must be noted that warm water temperatures occurs in fish farms in the south of China (25 to 37 °C) (Zhang et al., 2016), Philippine (25 to 35 °C during summer) (Bentsen et al., 2012), Thailand (28 to 31 °C) (Kayansamruaj et al., 2014) and the Mekong river in Vietnam (from 28 to 33 °C) (Thi et al., 2011; Trong et al., 2013). Thus, the FF losses by leaching into the water must be taken into account to administer the required dose of the drug. The negative impact on environmental health must also be considered.

The fact that sick animals take longer to ingest feed prolongs the time that medicated feed remains in the water, thereby facilitating FF leaching. Hence, recurring use of medicated feed at fish farms deliver high FF levels in the water. Indeed, studies conducted in China report high FF residues in the Huangpu River (Jiang et al., 2011) and the Yangtze River (Yan et al., 2013; Zhao et al., 2015), indicating continuous FF use in these areas. The most serious situation was detected in sea water, near the aquaculture farms in Dalian, where the presence of FF reached concentrations on the order of milligrams per litre (11 mg L<sup>-1</sup>) (Zong et al., 2010). In this regards, as demonstrated in this study, the use of the proper coating material in the medicated feed must help to minimize the FF leaching.

The antibiotic residues generated by fish farming can cause disorder in the aquatic ecosystem, which can lead to endocrine and immunosuppressive disorders in fish and damage to aquatic microflora (Liu et al., 2012) and microfauna (Martins et al., 2013) along with the development of antibiotic-resistant bacteria (Pruden et al., 2013). With respect to the latter, resistance to FF has been reported in isolates of *F. psychrophilum* from Chilean salmon farms (Henríquez-Núñez et al., 2012), *Pseudomonas* ssp. isolated from rainbow trout and sediments from Australian farms (Akinbowale et al., 2007), *Edwardsiella ictaluri* isolated from catfish in the United States (Welch et al., 2009), *Aeromonas* ssp. from sediments in France (Gordon et al., 2008), and *C. freundii*, *C. koseri*, *K. pneumoniae*, and *P. aeruginosa* collected from

water used to breed tilapia and mullet fish in Egypt (Ishida et al., 2010). Again, the use of the appropriate coating material in the medicated feed should help to minimize those adverse environmental effects.

## **5. Conclusions**

Simple, low cost, high throughput, and suitable analytical methods using UHPLC-MS/MS were developed and validated for determining FF in medicated feed and residues in water. Temperature, time of exposure in water, coating agent, and pellet size significantly affect FF leaching from medicated fish feed. FF leaching was more pronounced at higher temperature and was progressive with time. Vegetable oil was the most effective coating agent for reducing FF leaching, followed by LMP and CMC. Nevertheless, the vegetable oil showed a less homogeneous distribution of FF in the feed. There was no significant difference between the two levels of LMP evaluated. Medicated feed with a smaller diameter presented higher FF leaching and the rate of FF release decreased with increasing pellet size. This study demonstrates that the coating agent has a significant effect on the FF leaching rate and hence the required dose of the drug to be administered. Also, provides subsidies to fish producers for the responsible use of FF-coated feed, with respect to both proper dosing and minimization of risk to the environment, thereby contributing to the responsible use of antibiotics in fish farming.

## **Funding details**

This work was supported by the São Paulo Research Foundation-Agilent Technologies (FAPESP-Agilent Grant number 2013/50452-5); the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq Grant number 306141/2017-5), and to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES Grant number 3300301702P), Brazil.

## **Conflicts of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References

- Akinbowale, O.L., Peng, H., Grant, P., Barton, M.D., 2007. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 30, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.03.012>.
- Alday- Sanz, V., Corsin, F., Irde, E., Bondad-Reantaso, M. G., 2012. Survey on the use of veterinary medicines in aquaculture. *In: M.G. Bondad-Reantaso, J.R. Arthur & R.P. Subasinghe, eds. Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production*, pp. 29-44. FAO Fisheries Technical Paper N° 547. Rome, FAO. 207 pp.
- Barreto F., Ribeiro C., Hoff R.B., Costa T.D., 2016. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1449, 48–53. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.04.024.
- Bentsen, H.B., Gjerde, B., Nguyen, N.H., Rye, M., Ponzoni, R.W., Palada de Vera, M.S., Bolivar, H.L., Velasco, R.R., Danting, J.C., Dionisio, E.E., Longalong, F.M., Reyes, R.A., Abella, T.A., Tayamen, M.M., Eknath, A.E., 2012. Genetic improvement of farmed tilapias: Genetic parameters for body weight at harvest in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during five generations of testing in multiple environments. *Aquaculture.* 338–341, 56–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.027>.
- Binh, V.N., Dang, N., Anh, N.T.K., Ky, L.X., Thai, P.K., 2018. Antibiotics in the aquatic environment of Vietnam: Sources, concentrations, risk and control strategy, *Chemosphere.* 197, 438-450. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.061>.
- Bostock, J., McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., Little, D., Ross, L., Handisyde, N., Gatward, I., Corner, R., 2010. Aquaculture: global status and trends. *Philos. Trans. R. Soc., B.* 365, 2897–2912. DOI:10.1098/rstb.2010.0170.
- Bravo, S., Pozo, V., Silva, M.T., Abarca, D., 2013. Comparison of the fecundity rate of *Caligus rogercresseyi* infesting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) on farms in two regions of Chile. *Aquaculture.* 404–405, 55–58. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.04.002>.

- Busatto Z., Silva A.F.B., Freitas O., Paschoal J.A.R., 2017. LC-MS/MS methods for albendazole analysis in feed and its metabolite residues in fish fillet and a leaching study in feed after an alternative procedure for drug incorporation. *Food Addit. Contam. Part A*, 34, 509-519. DOI: 10.1080/19440049.2016.1272008.
- Duis, K., Inglis, V., Beveridge, M.C.M., Hammer, C., 1995. Leaching of four different antibacterials from oil- and alginate-coated fish-feed pellets. *Aquacult. Res.* 26, 549-556. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1995.tb00945.x>.
- EC, 2002. Commission Decision 2002/657 EC. Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results. 12 August 2002. Official Journal of the European Union, L 221/8-L 221/36.17.8.
- Eurico, J., Cyrino, P., José, Á., Bicudo, D.A., Sado, R.Y., Dairiki, J.K., 2010. A piscicultura e o ambiente - o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura / Fish farming and the environment – the use of environmental friendly feeds in fish culture. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 68–87. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010001300009>.
- Fais, A.P., Scarpino, R., Franco, B., Baldo, A.F., Freitas, O. De, Augusto, J., Paschoal, R., Paula, A., Scarpino, R., Franco, B., Baldo, A.F., 2017. LC-MS / MS methods for sulfadimethoxine and ormetoprim analysis in feed and fish fillet and a leaching study for feed after alternative procedures for the incorporation of drugs. *Food Addit. Contam., Part A*. 34, 501–508. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1267875>
- FDA, Food and drug Administration, 2004. Environmental Assessment for Aquaflor® 50% Type A Medicated Article for *Catfish*. Accessed April 2018: <<https://animaldrugstfda.fda.gov/adafda/app/search/public/document/downloadEA/110>>.
- Furones M.D., Rodgers C.J., 2009. Antimicrobial agents in aquaculture: practice, needs and issues. In: Rogers C. and Basurco B. (eds.). *The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture*. Zaragoza: CIHEAM, p. 41 -59 (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 86). Accessed August 2018: <<http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=801061>>.
- Gonc, C.S., Andre, B., Henriques-Almeida, M.D.M., 2007. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the



- crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 452–458. DOI:10.1016/j.ecoenv.2006.10.006.
- González-Gaya, B., Cherta L., Nozal L., Rico A., 2018. An optimized sample treatment method for the determination of antibiotics in seawater, marine sediments and biological samples using LC-TOF/MS. *Sci. Total Environ.*, 643, 994–1004. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.079.
- Gordon, L., Cloeckaert, A., Doublet, B., Schwarz, S., Bouju-albert, A., Ganière, J.P., Lebris, H., Le flèche-matéos, A., Giraud, E., 2008. Complete sequence of the floR-carrying multiresistance plasmid pAB5S9 from freshwater *Aeromonas bestiarum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 65–71. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn166>.
- Hashimoto J.C., Paschoal, J.A.R., de Queiroz J.F., Reyes F.G.R., 2011. Considerations on the use of malachite green in aquaculture and analytical aspects of determining the residues in fish: a review. *J. Aquat. Food. Prod. T.* 20(3), 273-294.
- Hayes, J., 2013. Determination of Florfenicol in Fish Feeds at High Inclusion Rates by HPLC-UV. *J AOAC Int* 96, 7–12. doi:10.5740/jaoacint.12-18
- He, S., Zhou, Z., Liu, Y., 2012. Do dietary betaine and the antibiotic florfenicol influence the intestinal autochthonous bacterial community in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* X *O. aureus*)? *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 785–791. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0871-7>.
- Henríquez-núñez, H., Evrard, O., Kronvall, G., Avendaño-herrera, R., 2012. Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. *Aquaculture.* 354–355, 38–44. DOI:10.1016/j.aquaculture.2012.04.034.
- Heuer, O.E., Kruse, H., Grave, K., Collignon, P., Karunasagar, I., Angulo, F.J., 2009. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin. Infect. Dis.* 49, 11–16. <https://doi.org/10.1086/605667>.
- Ishida, Y., Ahmed, A.M., Mahfouz, N.B., Kimura, T., El-Khodery, S.A., Moawad, A.A., Shimamoto, T., 2010. Molecular analysis of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 727–734. <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0538>.
- Jiang, L., Hu, X., Yin, D., Zhang, H., Yu, Z., 2011. Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu. *Chemosphere.* 82, 822–828. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.028>.

- Katsuda, M.S., McClements, D.J., Miglioranza, L.H.S., Decker, E.A., 2008. Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with beta-lactoglobulin and pectin. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5926-5931. DOI:10.1021/jf800574s.
- Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Katagiri, T., Hirono, I., Rodkhum, C., 2014. Molecular characterization and virulence gene profiling of pathogenic *Streptococcus agalactiae* populations from tilapia (*Oreochromis* sp.) farms in Thailand. *J. Vet. Diagn. Invest.* 26, 488–495. <https://doi.org/10.1177/1040638714534237>.
- Leung, T.L.F., Bates, A.E., 2013. More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: Implications for food security. *J. Appl. Ecol.* 50, 215–222. <https://doi.org/10.1111/1365-2644.12017>.
- Li, K., Liu, L., Hedegaard, J., Lu, M., Dalsgaard, A., 2016. Management measures to control diseases reported by tilapia (*Oreochromis spp.*) and whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmers in Guangdong, China. *Aquaculture.* 457, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.008>.
- Liu, W., Ming, Y., Huang, Z., Li, P., 2012. Impacts of florfenicol on marine diatom *Skeletonema costatum* through photosynthesis inhibition and oxidative damages. *Plant Physiol. Biochem.* 60, 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.08.009>.
- Marangoni, N. G. (2006) Produção de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (linhagem chitralada), cultivada em tanques-rede, sob diferentes densidades de estocagem. *Archivos de Zootecnia*, 55 (210), 127-138.
- Martins, A., Guimarães, L., Guilhermino, L., 2013. Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to *Daphnia magna* assessed at two temperatures. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36,1022–1032. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.09.001>.
- Merck, 2015. Aquaflor® Intervet/Merck Animal Health, Technical Bulletin (Florfenicol). Accessed July 2018: <<https://merckusa.cvpservice.com/product/basic/view/1047250>>.
- Mian, G.F., Godoy, D.T., Leal, C.A.G., Yuhara, T.Y., Costa, G.M., Figueiredo, H.C.P., 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Vet. Microbiol.* 136, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.016>.

- Mo, W.Y., Chen, Z., Leung, H.M., Oi, A., Leung, W., 2017. Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 8978- 8989. DOI:10.1007/s11356-015-5607-z.
- Monteiro, S.H., Francisco, J.G., Campion, T.F., Pimpinato, R.F., Andrade, G.C.R.M., Garcia, F., Tornisielo, V.L., 2015. Multiresidue antimicrobial determination in Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) cage farming by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Aquaculture* 447, 37-43. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.07.002.
- Mostafa, A.E., Salam, R.A.A., Hadad, G.M., Eissa, I.A., 2017. Simultaneous determination of selected veterinary antibiotics in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and water samples by HPLC/UV and LC-MS/MS. *RSC Adv.*, 7, 46171–46182. DOI: 10.1039/c7ra08398j.
- New, M.B., 1987. Feed and feeding of fish and shrimp: a manual on the preparation and presentation of compound feeds for shrimp and fish in aquaculture. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations and United Nations Environment Programme. Accessed July 2018: <[www.fao.org/docrep/s4314e/s4314e00.htm#Contents](http://www.fao.org/docrep/s4314e/s4314e00.htm#Contents)>.
- Norambuena, L., Gras, N., Contreras, S., 2013. Development and validation of a method for the simultaneous extraction and separate measurement of oxytetracycline, florfenicol, oxolinic acid and flumequine from marine sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 73, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.05.027>.
- Norwegian Institute of Public Health, 2013. Increased use of medicines in Norwegian fish farming. Accessed April 2018: <<https://www.fhi.no/en/hn/drug/fisk/increased-use-of-medicines-in-norwe/>>.
- Oppedal, F., Dempster, T., Stien, L.H., 2011. Environmental drivers of Atlantic salmon behavior in sea-cages: A review. *Aquaculture*. 311, 1–18. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.11.020
- Pan, X-D., Wu, P-G., Jiang, W., Ma, B-j., 2015. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol in fish muscle by matrix solid-phase dispersion extraction (MSPD) and ultra-high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Control* 52, 34-38. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.12.019.
- Paolucci, M., Fabbrocini, A., Grazia, M., Varricchio, E., Cocci, E., 2012. Development of biopolymers as binders for feed for farmed aquatic organisms. In: Dr. Muchlisin (Ed.), *Aquaculture. In tech*, Accessed April 2018:

- <https://mts.intechopen.com/books/aquaculture/development-of-biopolymers-as-binders-for-feed-for-farmed-aquatic-organisms->>. DOI:10.5772/28116.
- Pruden, A., Larsson, D.G.J., Amézquita, A., Collignon, P., Brandt, K.K., 2013. EHP – Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ. Health Perspect.* 121, 878–885. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1206446>.
- Ranjan, A., Sahu, N.P., Gupta, S., 2017. Prospects of medicated feed in aquaculture. *Nutr. Food Sci.* 3, 1-9. DOI:10.19080/NFSIJ.2017.03.555617.
- Rico, A., Satapornvanit, K., Haque, M.M., Min, J., Nguyen, P.T., 2012. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review. *Rev. Aquaculture.* 4, 75–93. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01062.x>.
- Rigos, G., Alexis, M., Nengas, I., 1999. Leaching, palatability and digestibility of oxytetracycline and oxolinic acid included in diets fed to seabass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquacult. Res.* 30, 841–847. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00410.x>.
- SINDAN, 2017. Sindicato Nacional da Industria de Produtos para Saúde Animal. Compendio de Produtos veterinários. Accessed April 2018: <<http://www.cpv.com.br/cpv/prodpesquisa.aspx?codigo=2885>>.
- Thi, P., Hoa, P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Shimizu, A., Hong, D., Hung, P., Suzuki, S., 2011. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Sci. Total Environ.* 409, 2894–2901. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.030>.
- Trong, T.Q., Mulder, H.A., Van Arendonk, J.A.M., Komen, H., 2013. Heritability and genotype by environment interaction estimates for harvest weight, growth rate, and shape of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) grown in river cage and VAC in Vietnam. *Aquaculture.* 384–387, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.12.022>.
- Walter, R.H., Talomie, T.G., 1990. Quantitative definition of polysaccharide hydrophilicity. *Food Hydrocolloids.* 4, 197–203. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80152-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80152-5).
- Wang, S., Chen, N., Qu, Y., 2011. Solubility of florfenicol in different solvents at temperatures from (278 to 318) K. *J. Chem. Eng. Data.* 56, 638–641. DOI:10.1021/je1008284

- Welch, T.J., Evenhuis, J., White, D.G., McDermott, P.F., Harbottle, H., Miller, R.A., Griffin, M., Wise, D., 2009. IncA/C plasmid-mediated florfenicol resistance in the catfish pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 845–846. DOI:10.1128/AAC.01312-08.
- Xu, D., Rogers, W.A., 1994. Leaching loss from oxytetracycline medicated feeds. *J Appl Aquaculture.* 4, 29–38. [https://doi.org/10.1300/J028v04n01\\_03](https://doi.org/10.1300/J028v04n01_03).
- Yan, C., Yang, Y., Zhou, J., Liu, M., Nie, M., Shi, H., Gu, L., 2013. Antibiotics in the surface water of the Yangtze Estuary: Occurrence, distribution and risk assessment. *Environ. Pollut.* 175, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.12.008>.
- Yanong, R.P., Curtis, E.W., Simmons, R., Bhattaram, V. A., Gopalakrishnan, k.N., Nagaraja, N.V., Derendorf, H., 2005. Pharmacokinetic Studies of Florfenicol in Koi Carp and Threespot Gourami *Trichogaster trichopterus* after Oral and Intramuscular Treatment. *J. Aquat. Anim. Health*, 17, 129-137. DOI: 10.1577/H03-065.1.Zarza, C. 2012. Oral delivery of veterinary medicines through aquafeed in Mediterranean aquaculture. In: M.G. Bondad-Reantaso, J.R. Arthur & R.P. Subasinghe, eds. *Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production*, p. 127-140. FAO Fisheries Technical Paper N° 547. Rome, FAO. 207 pp.
- Zarza, C. 2012. Oral delivery of veterinary medicines through aquafeed in Mediterranean aquaculture. In: Bondad-Reantaso, M.G., Arthur, J.R., Subasinghe, R.P. (Eds.) *Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production*, p. 127-140. FAO Fisheries Technical Paper N° 547. Rome, FAO. 207 pp. Accessed August 2018: <<http://www.fao.org/docrep/016/ba0056e/ba0056e.pdf>>.
- Zhang, J.S., Li, Z.J., Wen, G.L., Wang, Y.L., Luo, L., Zhang, H.J., Dong, H.B., 2016. Relationship between white spot syndrome virus (WSSV) loads and characterizations of water quality in *Litopenaeus vannamei* culture ponds during the tropical storm. *Int. J. Vet. Res.* 17, 210–214.
- Zhao, H., Zhou, J.L., Zhang, J., 2015. Tidal impact on the dynamic behavior of dissolved pharmaceuticals in the Yangtze Estuary, China. *Sci. Total Environ.* 536, 946–954. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.055>.
- Zong, H., Ma, D., Wang, J., 2010. Research on florfenicol residue in coastal area of Dalian (Northern China) and analysis of functional diversity of the microbial

community in marine sediment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 84, 245–249.  
DOI:10.1007/s00128-009-9923-1.

## CAPÍTULO IV

### FLORFENICOL LOSSES IN TOP-COATING FISH FEED PELLETS AND BY LEACHING INTO WATER: ENVIRONMENTAL AND ECONOMIC IMPLICATIONS

## **Florfenicol losses in top-coating fish feed pellets and by leaching into water: Environmental and economic implications**

F. M. Barreto<sup>1</sup>, P. Braga; H. Hisano<sup>2</sup>, F. G. Reyes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> <sup>a</sup>Department of Food Science, School of Food Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Rua Monteiro Lobato, 80, 13083-862, Campinas, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP-340, Km 127.5, Tanquinho Velho, *P.O Box* 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP, Brazil.

### Correspondence

Fabíola Málaga Barreto, Department of Food Science, School of Food Engineering, University of Campinas-UNICAMP, Campinas, SP, Brazil. E-mail: [fabiolamalagabarreto@gmail.com](mailto:fabiolamalagabarreto@gmail.com)





## 1. Introduction

Florfenicol (FF) is one of the most used antimicrobials in global aquaculture to treatment of bacterial diseases in several fish species, such as tilapia, rainbow trout and salmon (Bravo, Pozo, Silva, & Abarca, 2013; Mo, Chen, Leung, Oi, & Leung, 2017), being often administered orally, through medicated top-coating feed pellets with vegetable or fish oil. Although this technique is practical, still presents concerns due to veterinary drug losses into water, palatability and inefficient homogenization (Zarza, 2012).

Antibiotics leaching, combined with other sources of contamination can result an unbalance in the aquatic ecosystem, since it can affect vital functions, growth and reproduction of several species of microalgae and microcrustaceans (Lai, Hou, Su, & Chen, 2009; Ferreira, Nunes & Henriques-Almeida, 2007; Liu, Ming, Huang, & Li, 2012; Martins, Guimarães, & Guilhermino, 2013), along with the development of antibiotic resistance bacteria (Henríquez-Núñez, Evrard, Kronvall, & Avendaño-Herrera, 2012). Generally, losses in medicated feed preparation and by leaching into water are neglected, and can represent significant economic losses and environmental impact in fish farms. In order to simulate the practical procedures and conditions, the present work aimed to evaluate the FF losses in top-coating feed pellets and by leaching at different temperatures and exposure times.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 *Medicated feed preparation*

Three batches of medicated feed (500 mg) were prepared. For each one FF (Aquaflor, Merck Animal Health) was mixed with corn oil at  $1.20 \text{ mg kg}^{-1}$ . After, the emulsion was poured ( $2\% \text{ v m}^{-1}$ ) on commercial fish feed 4-6 mm (Pirá, Guabi Nutrição e Saúde Animal), using a mini coating pan (LM-DR, Lemaq) with slow rotation speed until complete homogenization.

## *2.2 Assessment of florfenicol losses in medicated feed preparation and by leaching into water*

To determine medicated feed losses after coating, the amount of FF was calculated by difference between the initial FF added in oil before the homogenization and the final FF in medicated feed analyzed by LC-MS/MS in twenty replicates. The leaching assay was conducted at two temperatures (22 °C and 28 °C) in pH 7 with three replicates. These values were defined, according to average temperatures and pH in winter and summer for tilapia culture in tropical countries (Marangoni, 2006). Feed samples (25 g) were placed in Erlenmeyer containing 500 mL of water, under shaking at 0.35 g in a temperature controlled shaker (4900, New Brunswick Innova). At 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 30 minutes aliquots of water were collected in a 50 mL polipropilene tube and stored under refrigeration (4 °C) for further analysis. FF leaching was calculated by the difference between the initial FF in the medicated feed and FF in water both analyzed by LC-MS/MS. To estimate economic losses the based value of FF was US\$620 per kg (R\$ 1.00=US\$ 0.31) and further calculated according to percentage of leaching, considering the most usual recommended dosage (10 mg kg<sup>-1</sup> of body weight, for ten consecutive days).

## *2.3 Florfenicol quantitation in medicated feed and water*

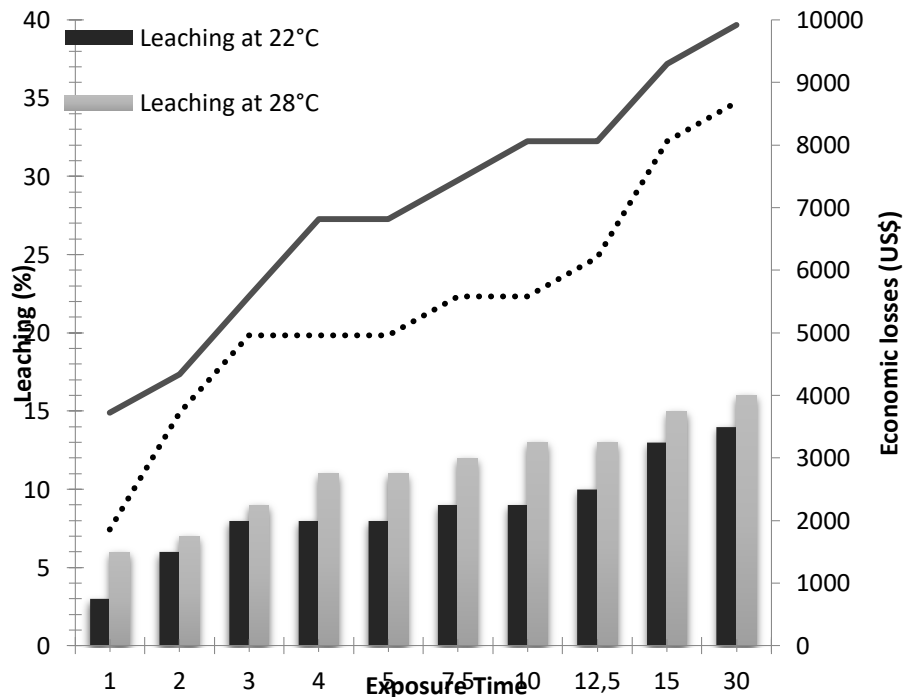
The extraction of FF was accomplished with acetonitrile (J T Baker). For each 1.00 g of the medicated feed was added 5 mL of acetonitrile, homogenized for 30 seconds in ultraturrax (MA 102, Marconi), vortexed for 5 minutes (Genie 2, Daiggr), and centrifuged at 12000 g for 5 min (5810R, Eppendorf). Afterwards, 1 mL of the supernatant was transferred to 2 mL microtube with 150 mg of MgSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) and 50 mg of Dodecyl-C18 (Agilent). The mixture was vortexed, centrifuged and the supernatant was filtered (0.22 µm), diluted in acetonitrile and injected in the LC-MS/MS (6460, Agilent Technologies) coupled with a UHPLC (1290, Agilent Technologies) with electrospray ionization (ESI). The chromatographic methods were validated following the EU Decision 2002/657/EC (EC, 2002).

#### *2.4 Statistical analysis*

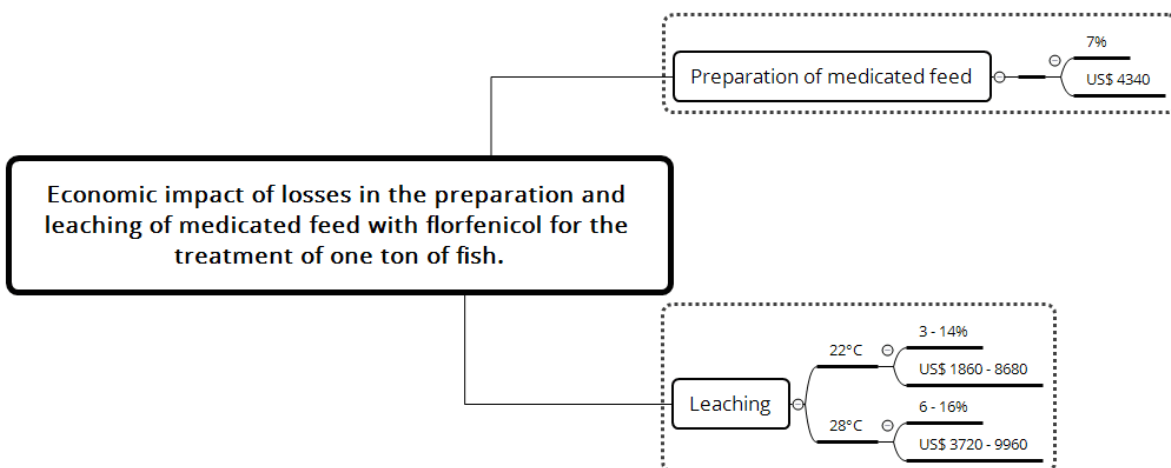
The data were subjected to a normality test and to analysis of variance (ANOVA). When a significant effect ( $p < 0.05$ ) was observed, the Student's t-test was applied at 5% of significance to compare the different temperatures. The analyzes were performed by SAS software v 8.2 (SAS, Cary, NC).

### **3. Results**

Twenty replicates (1.00 g) of each batch were analyzed. Losses in top-coating feed pellets ranged from 6.98% to 7.46, and occur in two stages: during the mixture of FF with the coating oil, as well as on the top-coating process (Figure 1). During the coating process a portion of the mixture (corn oil + FF emulsion) was retained in the wall of the coating pan. The leaching losses was significant ( $p < 0.05$ ) at all evaluated times in both temperatures, being progressive over time varying to 3-14% at 22 °C and 6-16% at 28 °C, corresponding to an estimated economic losses of US\$ 1860-8680 at 22 °C and US\$ 3720-9960 at 28 °C (Figure 1, 2).



**Figure 1.** Summary of the estimated economic impact of losses in the preparation and leaching of medicated feed with florfenicol for the treatment of one ton of fish, considering the most usual recommended dosage ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight, for ten consecutive days).



**Figure 2.** Percentage of florfenicol leaching from medicated top-coating feed pellets (4-6 mm) into water at  $22^\circ\text{C}$  and  $28^\circ\text{C}$  and estimated economic losses (US\$) calculated according to percentage of leaching, considering the most usual recommended dosage ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight, for ten consecutive days)

#### 4. Discussion

A significant amount of FF was lost during preparation of the medicated feed, as well as by leaching from the feed into water. Whereas most usual recommended dosage (10 mg kg<sup>-1</sup> body weight, for ten consecutive days), the economic losses caused by leaching of the FF during the first 30 minutes, can be as high as US\$ 9920 per ton of treated fish at 28 °C. Adding the FF losses during the medicated feed preparation, the economic losses can increase 45%, reaching approximately US\$ 14000 (Figure 2).

Considering that the large majority of fish farmers use interconnected circulating water bodies (Rico, Satapornvanit, Haque, Min, & Nguyen, 2012), the economics losses are not the only problem related with FF leaching. Studies have been shown that FF has a deleterious effect in growth of freshwater algae, as well as in marine algae performance (Lai et al., 2009; Ferreira et al., 2007). Additionally, FF affects the somatic growth, as well as the reproduction of microcrustacean (*Daphnia magna*), reducing the number of total eggs and increase the problems with unfertilized eggs (Martins et al., 2013).

Although the concentration required to cause damage to these organisms is often lower than detected in the aquatic environment, such effects have been assessed isolated, eliminating possible environmental variations such as the presence of catalysts (Wang, Wang, & Peijnenburg, 2016). In addition, the environment has a miscellany of compounds that often have a similar mechanism of action and can trigger a sum or synergistic effect on toxicity (Gonzalez-Pleiter et al., 2013).

In view of the results of the present study, special attention is necessary to reduce FF losses. Thus, more researches evaluating other coating agents to reduce losses during the preparation of medicated feed and by leaching should be encouraged. On the other hand, feed management with medicated feed must be carried out more carefully compared to common feed, avoiding overfeeding, and if there were some losses of medicated feed, they must be collected from the water at maximum interval of 15 minutes.

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support received from the the São Paulo Research Foundation - FAPESP (2013/50452-5) and to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES (3300301702P), Brazil. We also thank Sóstenes G. O. Bueno for their assistance during the analysis.

## References

- Bravo, S., Pozo, V., Silva, M. T., & Abarca, D. (2013). Comparison of the fecundity rate of *Caligus rogercresseyi* infesting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) on farms in two regions of Chile. *Aquaculture*, 404–405, 55–58.
- EC, 2002. Commission Decision 2002/657 EC. *Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results*. 12 August 2002. Official Journal of the European Union, L 221/8-L 221/36.17.8.
- Ferreira, C. S. G., Nunes, A. B., Henriques-Almeida, J. M. M & Guilhermino, L. (2007). Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, 452–458.
- Gonzalez-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Legane´s, F., Rosal, R., Boltes, K., Marco, E., & Fernandez-Pinas, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research*, 47, 2050-2064.
- Henríquez-Núñez, H., Evrard, O., Kronvall, G., & Avendaño-Herrera, R. (2012). Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. *Aquaculture*, 354–355, 38–44.
- Kim, J., Park, J., Kim, P. G., Lee, C., Choi, K., & Choi, K. (2010). Implication of global environmental changes on chemical toxicity-effect of water temperature, pH, and ultraviolet B irradiation on acute toxicity of several pharmaceuticals in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, 19(4), 662–669.

- Lai, H., Hou, J., Su, C., & Chen, C. (2009). Effects of chloramphenicol , florfenicol , and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa* , *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 329–334.
- Liu, W., Ming, Y., Huang, Z., & Li, P. (2012). Impacts of florfenicol on marine diatom *Skeletonema costatum* through photosynthesis inhibition and oxidative damages. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, 165–170.
- Marangoni, N. G. (2006) Produção de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (linhagem chitralada), cultivada em tanques-rede, sob diferentes densidades de estocagem. *Archivos de Zootecnia*, 55 (210), 127-138.
- Martins, A., Guimarães, L., & Guilhermino, L. (2013). Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to *Daphnia magna* assessed at two temperatures. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 6, 1022–1032.
- Mo, W. Y., Chen, Z., Leung, H. M., & Leung, A.,O., W. (2017). Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(10), 8978–8989.
- Rico, A., Satapornvanit, K., Haque, M. M., Min, J., & Nguyen, P. T., Telfer, T., C. & Brink, P. J. (2012). Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks : a critical review. *Reviews in Aquaculture*, 4(2), 75–93.
- Wang, Z., Wang, S., & Peijnenburg, W. J. G. M. (2016). Prediction of joint algal toxicity of nano-CeO<sub>2</sub>/nano-TiO<sub>2</sub> and florfenicol: Independent action surpasses concentration addition. *Chemosphere*, 156, 8–13.
- Zarza, C. (2012). *Oral delivery of veterinary medicines through aquafeed in Mediterranean aquaculture*. In: M.G. Bondad-Reantaso, J.R. Arthur & R.P. Subasinghe, eds. Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production, p. 127-140. FAO Fisheries Technical Paper N° 547. Rome, FAO. 207 pp.



CAPÍTULO V  
DIGESTIBILITY OF FLORFENICOL IN NILE TILAPIA AND ITS INTERACTION  
WITH NUTRIENTS AND ENERGY DIGESTIBILITY

## **Digestibility of florfenicol in Nile tilapia and its interaction with nutrients and energy digestibility**

Fabíola Málaga Barreto\*<sup>a</sup>, Patrícia Aparecida de Campos Braga<sup>a</sup>, Hamilton Hisano<sup>b</sup>, Felix Guillermo Reyes Reyes<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Food Science, School of Food Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Rua Monteiro Lobato, 80, 13083-862, Campinas, SP, Brazil

<sup>b</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa – EMBRAPA- Meio Ambiente, Rodovia SP-340, Km 127.5, Tanquinho Velho, P.O. box 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP, Brazil.

*E-mail address:* Patrícia Aparecida de Campos Braga (*pbraga2015@gmail.com*), Hamilton Hisano (*hamilton.hisano@embrapa.br*), Felix Guillermo Reyes Reyes (*reyesfgr@gmail.com*).

\* Corresponding author. Phone: +55 19 981004079 (Fabíola Málaga Barreto)

*E-mail address:* *fabiolamalagabarreto@gmail.com*

**Abstract**

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is one of the most important species, cultured predominantly in intensive and semi-intensive systems. Along with intensification, bacteriosis becomes more frequent, making the use of antimicrobials to control some diseases. Florfenicol is one of the most used antimicrobials in aquaculture, being often administered orally, through medicated feed. The objective of this study was to evaluate the apparent digestibility of florfenicol in Nile tilapia ( $35\text{g} \pm 2$ ) at  $26^{\circ}\text{C}$  and to verify possible interference of the drug with nutrients and digestibility energy. Furthermore, an analytical method using UHPLC-MS/MS was developed and validated to quantify florfenicol in medicated feed, feces and water. The apparent digestibility of florfenicol was in average 96%. Enhancement ( $P < 0.05$ ) on apparent digestibility of dry matter, crude protein and crude energy were observed. However, the drug has no significant effect on the apparent digestibility of total lipid. Although florfenicol improve apparent digestibility of some nutrients, its use is recommended only therapeutically in tilapia diets.

**Keywords:** antibiotic; environment; nutrition; *Oreochromis niloticus*.

## 1. Introduction

While capture fishery stocks are stagnated since 1980s, global aquaculture has grown over the past 50 years, increasing its contribution in fish production from 5% in 1960 to 45% in 2014, which totalized 73.8 million of metric tons of total fish production, generating approximately \$160.2 billion, (FAO, 2016). Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is one of the most important species in overall fish production and can contribute to approximately 70% of production in some countries (Haygood and Jha 2016). Recent statistical data showed that world Nile tilapia production reached 5.3 million of metric tons in 2014, and was valued around \$ 8,8 billion (FAO, 2017). The increase in tilapia production is related to some positive characteristics, such as high productivity, ease adaption to diverse breeding conditions, low susceptibility to parasitic diseases, lower value-added diet acceptance, sensorial characteristics that please the consumer, and relatively stable market price which favors its commercialization (Ng and Romano 2013).

To attempt the growth of production and demand by the consumers, fish farming has been developed predominantly in an intensive and semi-intensive system, which results in stressful conditions for animals (Burrige et al. 2010; Leung and Bates 2013), affecting the immune system and benefit the development of opportunistic pathogens (Cyrino et al. 2010). To avoid production losses and animal welfare problems, veterinary drugs have been used in fish farming, mainly antibiotics which are applied in large scale (Kümmerer 2009). According to Rico et al. 2012 it is estimated that more than 36 different types of antibiotics are used by the world's largest farming fishers, although there are few antimicrobials specifically developed for aquaculture.

Florfenicol is one of the most used antimicrobials in fish farming, it performs as a bacteriostatic, preventing bacterial protein synthesis, covering a broad spectrum of action, and showing effective responses against Gram-positive and Gram-negative bacteria (Soto et al. 2010; Norambuena et al. 2013), being rather administered orally, through medicated diet (Ferreira et al. 2007). Although it is easily applied by fish farmers, this technique has some concerns. According to Pouliquem et al. (2009), medication through feed can result in 70-80% of drug losses into the aquatic environment, leaching of unconsumed diet and excretion of the drug through urine and feces, which may result in ecotoxicity for aquatic organisms (Martins et al. 2013) and the development of resistant bacteria (Liu et al. 2012), which is one of the highest

problems of animal and human health around the world. In addition, diet-drug interaction may lead to changes in pharmacokinetics (Mouly et al. 2017), as well as changes in nutrient absorption (Reda et al. 2013).

The drug assimilated by the animal can be quantified through a bioavailability or apparent digestibility studies. The bioavailability is defined by the portion of the total content of ingested drug that reaches systemic circulation (Agoram et al. 2001), being determined by blood samples once the administration of a single dose of the drug is performed orally or intravenously (Ranjan et al. 2017). On the other hand, apparent digestibility coefficient (ADC) is conducted by comparing the content of the compound/nutrient found in the feces and in the diet, having an advantage over the previous method, because it allows the evaluation of possible interaction on the use of nutrients, amino acids, energy and minerals with some drugs.

According to Cravedi et al. (1987), the evaluation of ADC, generally is neglected in studies with antibiotics for several species of fish, and the effects of oral administration of antibiotics can interfere on carbohydrates, lipids and protein absorption, as observed in mammals. In fact, some studies with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) revealed improvement in the ADC of some unsaturated fatty acids in fish fed medicated diets with chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline (Cravedi et al. 1987) and into lipid ADC in fish fed with avoparcin (Zoccarato et al. 1995). Furthermore, enhancement of ADC of dry matter (DM), crude protein (CP), lipid, and energy was observed in rainbow trout fed diets with combination of two antibiotics (gentamycin and flumequine) (Choubert et al. 1991).

In order to understanding the influence of veterinary drugs on nutrient absorption, reliable analytical methods are essential to evaluate the concentration of veterinary drugs present in medicated feed intended for fish as well as in feces. Nevertheless, studies regarding analytical methods for determining veterinary drugs on these matrices are limited on the literature (Choubert et al. 1991; Cravedi et al., 1987; Rigos et al., 1999).

To date, there are no studies reported on FF digestibility and its possible interaction with nutrients of medicated diets in fish species. Thus, the objective of this study was to evaluate the ADC of FF in Nile tilapia and verify possible interference of the drug in the absorption of DM, CP, total lipid and crude energy (CE) in the diet. In order to quantify FF in medicated feed, feces and water, an analytical method using UHPLC-MS/MS was developed and validated.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Ethical statement*

The experiment was approved by Committee for Ethics in Animal Experimentation at the Embrapa Meio Ambiente (Protocol number: 002/2017).

### *2.2. Diets*

The diets were formulated to be isocaloric, according to the tilapia nutritional requirements (NRC, 2011), as in Table 1. Chromic oxide ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) was included in the diets as the non-absorbed marker. The FF was added in form of premix with 50% of the drug in concentration of 0.1% (Aquaflor, Schering Plough). The ingredients were ground to 0.5mm particles, homogenized and hydrated (20%) with hot water (60°C) for pelletizing in conventional meat grinder, in the form of 2,5mm diameter pellets, then dried in a forced air oven for 24 h at 55°C and stored under refrigeration (-18°C). In the control diet florfenicol was not added.

**Table 1.** Formulation content of experimental diets

Ingredient (g kg <sup>-1</sup> )	Drug levels	
	Reference diet	Test
	0	0.1
Soybean meal	594.00	592.00
Corn	227.90	227.90
Wheat middlings	100.00	100.00
Soybean oil	24.50	24.50
Dicalcium phosphate	39.00	39.00
L-Lysine (78%)	1.00	1.00
DL Methionine (99%)	3.70	3.70
Threonine	2.70	2.70
Sodium chloride	1.00	1.00
Vitamin and mineral premix <sup>a</sup>	5.00	5.00
Butyl hydroxyl toluene	0.20	0.20
Chromic oxide	1.00	1.00
Total	1000	1000
Calculated and determined chemical composition		
Digestible protein (%) <sup>b</sup>	28.00	28.00
Crude protein (%) <sup>c</sup>	35.50	36.20
Crude energy (cal g-1) <sup>d</sup>	3147	3150
Ether extract (%) <sup>e</sup>	5.76	5.62
Crude fiber (%) <sup>c</sup>	3.91	3.58
L-Lysine <sup>b</sup>	1.55	1.55
DL Methionine <sup>b</sup>	0.60	0.60
DL Threonine <sup>b</sup>	1.18	1.18
Calcium	1.05	1.05
Phosphorus	0.70	0.70

<sup>a</sup> Composition of vitamin-mineral premix (Vaccinar, Belo Horizonte, MG, Brazil) kg diet<sup>-1</sup>: vit. A: 500,000 UI, vit. D3, 250,000 UI, vit. E 5,000 mg, vit. K3, 500 mg, vit. B1 1.000 mg, vit. B2: 1.000 mg, vit. B6: 1,000 mg, vit. B12: 2,000 mg, niacin: 2.500, folic acid: 500 mg, biotin: 10 mg, vit. C 10,000 mg, choline: 100,000 mg, Inositol: 1,000 mg, selenium: 30 mg, iron: 5,000 mg, copper: 1,000 mg, manganese: 5,000 mg, zinc: 9,000 mg, cobalt: 50 mg, iodine: 200 mg. <sup>b</sup> Estimated values based on digestible nutrients determined by Abimorad, Squassoni, and Carneiro (2008). <sup>c</sup> Analyzed values according to AOAC (2016). <sup>d</sup> Analyzed based on dry matter. <sup>e</sup> Analysed by Bligh Dyer methodology (Bligh and Dyer, 1959).

### 2.3. Experimental procedures

Juvenile Nile tilapia ( $n=100$ ,  $35.0 \pm 5$ g) were weighed individually and randomly allocated, with similar biomass, in two cages (80L) inside a fiberglass tank (2000L), with continuous circulation of water ( $1 \text{ L min}^{-1}$ ), at a 50 animals per cage density. The tank was equipped with continuous aeration in order to keep the dissolved oxygen (DO) concentration in water above  $6 \text{ mg L}^{-1}$ , with an electric heater to maintain water temperature at  $26 \text{ }^\circ\text{C}$  and a biological filter. All quality parameters were measured twice a day (8 am and 5 pm) using a multiparameter (U-50, Horiba, Minami-ku, Kyoto, Japan) to ensure the following ranges:  $\text{O}_2$  (6.5 to  $7.0 \text{ ml L}^{-1}$ ), pH (7.0 to 8.0) and stable temperature. Total ammonia nitrogen ( $0.02 \text{ ml L}^{-1}$ ) was measured with a commercial kit (Hach, Loveland, CO, USA). A 12 h light: dark regime was adopted with daybreak set at 6:30 h. The experiment lasted a month, being conducted with the same group of fish. For this, the experiment was started with unmedicated diet (control) for 11 days and after an interval of one week followed the experiment with the medicated diet for the same time.

Fish were acclimated to experimental facility for 14 days before collecting feces. Feeding diet was done several times in the morning (at 8 h to 12 h) until apparent satiety. Half an hour after the last meal, the cages were then transferred to the collector tank (cylindrical conical bottomed tanks with 200L capacity, having controlled temperature, supplementary aeration and coupled to the collection vial), where they remained for 5 h to collect the feces by sedimentation. The collection time was based on the gut transit rate (Uscanga et. al. 2010), leaving the feces in contact with water for the shortest possible time, to prevent leaching of the drug. After that the fishes were taken back to the feeding tank. The collected feces were centrifuged (8 min; 3000 g) and the supernatant discarded, an amount was frozen for further quantitation of FF, while the remainder was dried in a forced air oven ( $55^\circ\text{C}$ ; 12h) for other analysis. The feces collected during the first three days of each experiment were discarded, and only the others were used for analysis.



The ADC of FF, CP, CE, total lipids, and DM were determined as described Cho et al. (1985):

$$ADC (\%) = 100 - \left[ 100 \times \left( \frac{\% I_d}{\% I_f} \times \frac{\% N_f}{\% nNd} \right) \right]$$

Where: ADC = apparent digestibility coefficient;  $I_d$  = indicator of diet;  $I_f$  = indicator of feces;  $N_d$  = nutrient of diet;  $N_f$  = nutrient of feces.

#### *2.4. Chemical analyses*

Chemical analysis of CP, CE, DM and chromium oxide at diets and feces was performed using standard AOAC methods (2016). Total lipids were determined by Bligh drier (Bligh and Dyer, 1959). Chromium oxide content of diets and feces were determined after digestion with nitro perchloric acid (Sigma Aldrich-St. Louis, MO, USA) using an atomic absorption spectrophotometer 220 FS series (Varian, Lake Forest, California USA). All analyses were formed in triplicate.

#### *2.5. Florfenicol quantitation in medicated feed, feces and water*

##### *2.5.1. Sample preparation*

The extraction of FF was accomplished with acetonitrile (JT Baker-Ecatepec, MC, Mexico). For each 1.00g of the feed and 0.50g of the feces was added 5.0mL of acetonitrile, homogenized for 30 seconds in ultraturrax (TE102 model, Catel, NC, USA), vortexed for 5 minutes (Genie 2 vortex model, Daigger, Bohemia, NY, USA) and centrifuged at 12,000 g for 5 minutes (Eppendorf centrifuge model 5810R, Hamburg, Germany). Afterwards, 1.0mL of the supernatant was transferred to a microtube along with 150 mg of  $MgSO_4$  (Sigma Aldrich-St. Louis, MO, USA) and 50 mg of Dodecyl-C18 (Agilent-Santa Clara, CA, USA). The mixture was vortexed, centrifuged (Gyrozen Mini Centriges, Yuseong-gr, Daejeon, Korea) and the supernatant filtered through 0.22  $\mu m$  polytetrafluoroethylene membrane (PTFE), diluted (in acetonitrile) and injected in the UHPLC-MS/MS system. Water samples collected in the collect tank were simply filtered (0.22  $\mu m$ ) and injected in the UHPLC system.

### 2.5.2. UHPLC-MS/MS conditions

Determination of the florfenicol content in the feed, feces and water was performed by LC-MS/MS in an Agilent 6460 triple quadrupole tandem mass spectrometer coupled with a UHPLC 1290 system (Agilent Technologies, CA, USA) with electrospray ionization (ESI) source in the negative ion mode. For FF content in feed, the chromatographic separation was carried out in a SB C18 column (2.1  $\mu\text{m}$ , 1.8 mm  $\times$  50 mm) (Agilent Technologies, CA, USA) using a ternary mobile phase comprising by 0.1% formic acid solution (A) and acetonitrile: methanol 50:50 v/v (B). The gradient program was used as follows: 0 to 0.7 min  $\rightarrow$  70% A and 30% B; 0.71 to 1.50 min  $\rightarrow$  10% A and 90% B; 1.51 to 2.50 min  $\rightarrow$  90% A and 10% B; 2.5 to 3.00 min  $\rightarrow$  return to the initial ratio for analytical column reconditioning. For quantitation of FF residues in feces, a SB C8 column (3,0 mm x 1,8  $\mu\text{m}$ , 100 mm) (Agilent Technologies, CA, USA) was applied, using a ternary mobile phase comprising by 0.1% formic acid solution (A) and acetonitrile:methanol 50:50 v/v + 0.1% acetic formic (B). The gradient program was used as follows: 0 to 0.5 min  $\rightarrow$  70% A and 30% B; 0.5 to 2.30 min  $\rightarrow$  5% A and 95% B; 2.31 to 3.00 min  $\rightarrow$  return to the initial ratio for analytical column reconditioning. For quantitation of FF residues in water, an SB C8 column (3.0 mm x 100 mm x 1.8  $\mu\text{m}$ ) (Agilent Technologies, CA, USA) was employed, using a ternary mobile phase composed of a 0.1% acetic acid solution (A) and ACN:MeOH (50:50 v/v) with 0.1% acetic acid (B) in isocratic mode. For all (feed, feces and water sample) the employed flow was 0.6 mL min<sup>-1</sup>, the column temperature were maintained at 45°C and the injection volume was 1  $\mu\text{L}$  for feed and water and 3  $\mu\text{L}$  for feces. For the MS operating conditions the following parameters were set: gas temperature, 300 °C; gas flow, 12 L min<sup>-1</sup>; nebulizer, 30 psi; sheath gas flow, 10 L min<sup>-1</sup>; sheath gas temperature, 250°C; Capillary voltage, 3.0 kV and nozzle voltage, 1.0 kV. Sample analyses were performed in the multiple-reaction monitoring (MRM) scan mode, using a dwell time of 100 ms per channel. The specific precursor ion monitored was m/z 356,0 concerning the FF molecule and it was quantified and identified by monitoring the transitions m/z 356,0 $\rightarrow$ 336,0 and m/z 356,0 $\rightarrow$ 185,0, respectively. The optimized mass spectrometric parameters were established: fragmentor, 116 V and collision energy 4 V for transitions m/z 356,0 $\rightarrow$ 336,0 (quantifier ion) and 16 V for transitions m/z 356,0 $\rightarrow$ 185,0 (qualifier ion). Fragment ions with the highest intensity were chosen for quantitation. Analytical

instrument control, data acquisition, and data process were performed using MassHunter software workstations (Agilent Technologies, USA).

### 2.5.3. Validation

Validation of the method was carried according to the Commission Decision 2002/657 EC, considering the following parameters: selectivity, linearity, limits of detection and quantitation (LD and LQ, respectively), precision and accuracy.

Selectivity was evaluated analyzing 20 blank samples (i.e. feed and feces without FF) in order to verify the absence of potential interfering compounds at the retention times of the analite. The matrix effect was evaluated by comparing the results of the calibration curve in solvent with the analytical curve in extract of the matrix. To assess the homogeneity of variances Fisher-Snedecor test (F-test,  $\alpha = 0.05$ ) was applied, and test t Student ( $\alpha = 0.05$ ) was employed to verify the presence/absence of matrix effect. Linearity was evaluated by Analysis of Variance (ANOVA for a 95% confidence interval) by the construction of the calibration curve on three genuine replicates, with 7 levels. Medicated feed calibration curve had equal intervals of  $50 \text{ ng mg}^{-1}$ , with its range starting with  $50 \text{ ng mg}^{-1}$  and ending with  $350 \text{ ng mg}^{-1}$ . Calibration curve for analyses of feces ranged from 1.0 to 30.0,  $\text{ng mg}^{-1}$ . Limit of detection (LD) and Limit of quantitation (LQ) in the method for FF residues in feces were determined as the minimum concentration of FF that produced a signal noise (s/n) ratio three and ten times respectively. Intraday precision was determined by fortification of 6 blank sample independent replicates, at three levels ( $50, 200$  and  $350 \text{ ng mg}^{-1}$  for the feeds and  $1.0, 15.0$  and  $30.0 \text{ ng mg}^{-1}$  for feces). Inter-day precision was prepared in the same manner as intraday precision, at three different days. Recovery (accuracy) was evaluated by FF fortification (before extraction) of the blank feed matrix in 6 independent replicates at ( $50, 200$  and  $350 \text{ ng mg}^{-1}$  for the feeds and  $1.0, 15.0$  and  $30.0 \text{ ng mg}^{-1}$  for feces).

### *2.6. Statistical analyses*

All data were subjected to a normality test, homogeneity of variance, and one-way analysis of variance (ANOVA) to determine any differences among treatments. A test t Student was employed to determine differences occurred among

treatments. All data were analyzed using SAS software Version 8.2. (SAS, Cary, NC, USA). Significance was set at  $p$  value  $< 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Digestibility of florfenicol, crude protein, total lipid and dry matter and florfenicol residues into the water

The ADC (%) are represented as mean  $\pm$  standard deviation with significance level 5%, in table 3. The amount of FF residues found into the water were lower than LQ ( $0,05 \text{ ng mg}^{-1}$ ) established in the method validation.

**Table 3.** Apparent digestibility coefficient (ADC) of florfenicol and their influence on digestibility of crude energy and crude protein.

ADC (%)	Diets	
	Reference	Florfenicol
Florfenicol	-	96.01
Dry matter	59.24 <sup>a</sup> ( $\pm 2.21$ )	70.43 <sup>b</sup> ( $\pm 1.23$ )
Crude protein	72.76 <sup>a</sup> ( $\pm 5.26$ )	86.58 <sup>b</sup> ( $\pm 1.85$ )
Crude energy	56.53 <sup>a</sup> ( $\pm 6.80$ )	75.39 <sup>b</sup> ( $\pm 1.14$ )
Total lipids	61.14 <sup>a</sup> ( $\pm 2.52$ )	62.72 <sup>a</sup> ( $\pm 2.73$ )

Values expressed by mean  $\pm$  SD of three replicates. Averages on the same line followed by the same letters means not significant differences ( $p < .05$ ) (test t Student).

#### 3.2. Method validation

The results of method validation are represented in table 2. No interference peak was detected at the retention time of the target analytes in all blank matrices demonstrating analytical method selectivity. The matrix effect was absent in all treatments (using values of  $F_{\text{tab}} = 19$  and  $t_{\text{tab}} = 2.71$  for 5 degrees of freedom). The LD and LQ were adequate for the analysis. Precision and accuracy recovery tests were satisfactory for all fortification levels. In this way, the methods are adequate for all parameters studied.

**Table 2.** Analytical validation of Florfenicol in medicated diet and feces

Matrix	Concentration (ng mg <sup>-1</sup> )	Linearity r	Matrix effect		LD (ng mg <sup>-1</sup> )	LQ (ng mg <sup>-1</sup> )	Precision CV (%)			Accuracy (%)
			F <sub>cal</sub>	t <sub>cal</sub>			Day 1	Day 2	Day 3	
Diet	50		2.22	1.27			3	4	4	97
	200	9.923	3.12	1.50	0.02	0.05	3	3	4	105
	350		2.73	0.99			5	3	7	102
Feces	1		1.11	1.67			12	14	14	83
	15	9.921	1.38	0.23	0.02	0.05	6	8	10	97
	30		0.46	0.88			5	7	3	92
Water	1		6.08	1.88			2	4	2	-
	15	9.929	3.45	1.68	0.02	0.05	4	10	11	-
	30		2.01	1.25			6	3	2	-

CV = Coefficient of variation; LD = Limit of detection; LQ = Limit of Quantitation; F<sub>cal</sub> = F value calculated by Fisher-Snedecor test; t<sub>cal</sub> = t value calculated by test t Student (both at  $\alpha = 0.05$ ). Values expressed by mean of three genuine replicates.

#### 4. Discussion

Florfenicol presented an ADC of 96% in Nile tilapia, under the evaluated conditions. We are not aware of any studies that have quantified FF ADC in any species of fish. On the other hand FF bioavailability has already been evaluated for some fish species as: Cod *Gadus morhua*, presenting 91% (Samuelsen et al. 2003), Atlantic salmon (*Salmo salar*) with 96% (Martinserp et al. 1993), and Korean catfish (*Silurus asotus*) with 93% (Park et al. 2006). Although the bioavailability and ADC represented different methods, the values found in the present study compared to those mentioned previously were similar. The same was noted for oxolinic acid and oxytetracycline. A bioavailability study in rainbow trout (in water at temperature of 16°C, after oral dose - 75 mg kg<sup>-1</sup>) showed the amount of 13,6% and 5,6%, respectively (Björklund et al, 1991) while a digestibility study with the same specie at 14°C showed values very similar:14% and 7% respectively (Cravedi et al. 1987). This results demonstrating that the ADC assay can be used to evaluate the use of the drug by the animal while assessing its interference in nutrient absorption.

Few studies have used the ADC methodology to quantify the amount of drugs excreted unaltered in the feces and the influence of the drug on the absorption of nutrients. The influences of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline on lipid ADC were evaluated at two concentrations (0.1 and 0.5%) in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at 14°C by Cravedi et al. (1987). The results showed that these antibiotics have no significant effect on the total lipid ADC and the content chloramphenicol presented ADC at 99% for both concentrations while oxolinic acid the values ranged from 14% to 38% being influenced by concentrate. Oxytetracycline was the worst ADC, and just 7 to 9% was absorbed by the fish. The oxytetracycline and oxolinic acid ADC also was studied in seabass (*Dicentrarchus labrax* L) at two different temperatures (16°C and 24°C). For this species, oxolinic acid was also absorbed more efficiently than oxytetracycline, with the ADC of the drugs being influenced by temperature. Both were highly absorbed at 24°C (94% and 85%, respectively), with loss of approximately of one third, when reducing the temperature to 16°C (64% and 59%, respectively) (Rigos et al. 1999).

Florfenicol has lipophilic characteristics which give it good penetration into tissues (Schwarz et al. 2004), besides having a high pKa value (9.0), characteristic that prevents drug molecules from ionizing in the stomach pH, facilitating absorption by the intestinal epithelium (Lim et al. 2010). The variation of absorbed drug concentration is also

related to the inherent conditions of the species. Tilapia has a relatively high intestinal coefficient (6.26) and the longer the intestine, the longer the drug is in contact with the gut wall, providing better absorption (Gominho-Rosa et al. 2015).

Drug presence in the diet has increased the ADC of DM, CP and CE significantly ( $P < 0.05$ ), while total lipid content has not been influenced by the FF. The mechanism of action exerted by antibiotics to improve nutrient uptake, assuming growth promoter characteristics, is not fully understood, however since intestinal bacteria can inactivate pancreatic enzymes and metabolize dietary proteins, but believed it is believed that antibiotics given in therapeutic under dosage may promote selection in these microorganisms (FAO, 2016) favoring the absorption of nutrients. (Serrano, 2005).

The reduction of the autochthonous intestinal bacterial community of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ x *O. aureus* ♂) was evidenced by He et al. (2012) after administration (for 8 weeks) of extruded diet with FF (0.002% w/w). In another study, when evaluating the administration of the drug (10 and 20 mg Kg<sup>-1</sup> for 8 weeks) in tilapia hybrids, the team has verified a reduction in the population of two species of cyanobacteria, which has the characteristic of storing a large quantity of nutrients (He et al. 2010). The use of this drug as a growth promoter in Nile tilapia (*O. niloticus*) was studied by Reda et al. (2013). After 12 weeks of administration of medicated diet with FF (5 mg kg<sup>-1</sup>), there was a significant increase in weight. Studies in the epithelial tissues of the gut wall showed a reduction in its thickness, which could have contributed to a greater absorption of the nutrients and consequently a greater increase of the weight.

The aquatic environment functions as a reservoir of resistant genes (Stoll et al. 2012) and may be a direct and indirect source of propagation, affecting not only aquatic fauna. Prolonged use of antibiotics in sub therapeutic dosages may increase the incidence of bacterial resistance (FAO, 2016). According to estimates by the World Health Organization, the problems generated by bacterial resistance consume more than 34 billion dollars, only in the United States (WHO, 2014). In the European Union the use of antimicrobials as growth promoters has been banned since 2006, and since then bacterial resistance has been reduced (FAO, 2016).

In Chile the infection caused by the bacterium *Flavobacterium psychrophilum* generates great economic losses since 1993. With the introduction of new antimicrobials such as oxytetracycline and more recently, FF, the outbreaks were controlled. However, inappropriate drug employment has already resulted in the development of resistant genes.

When evaluating the bacterial resistance of 40 isolates of *F. psychrophilum* from Chilean salmon farms, researchers report that 92.5% of the isolates presented resistance to FF (Henríquez-núñez et al. 2012).

Some producers, noting that the therapeutic dosage does not have the expected effect, increasing the concentration of the drug and longer treatment time (Bravo, 2012; Li et al., 2016) and the consequence in feed conversion may be the opposite to growth promoting effects. According to a study conducted by Gaikowski et al. (2013) administration of 45 mg Kg<sup>-1</sup> and 75 mg Kg<sup>-1</sup> dosage for 20 consecutive days in Nile tilapia resulted in a reduction of 16% and 23% respectively in relation to the animals that received the control diet (without the drug), in addition to significantly reducing the palatability, with consumption of 37.5% less of the 45 mg Kg<sup>-1</sup> dose and 44.7% of 45 mg Kg<sup>-1</sup> dose.

## 5. Conclusion

Simple and suitable analytical methods using UHPLC-MS/MS were developed and validated in compliance with Commission Decision 2002/657/EC, for determining FF in medicated feed and residues in feces. Furthermore, FF showed high ADC for Nile tilapia, improving DM, CP and CE digestibility. However, is important to highlight that the use of antibiotics as growth promoters is banned in several countries and should not be applied for this purpose in order to avoid the development of resistant bacteria.

## Acknowledgment

The authors would like to thank the São Paulo Research Foundation-Agilent Technologies for supplying the Agilent UHPLC 1290-MS/MS 6460 system employed in this study (FAPESP-Agilent Grant number 2013/50452-5); and to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES Grant number 3300301702P), Brazil.

## References

Abimorad EG, Carneiro D J (2004). Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração proteica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). R Bras de Zootec 33:1101–1109.



- Agoram B, Woltosz WS, Bolger MB (2001). Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. *Adv Drug Deliv Rev* 1035: 8–15
- AOAC (2016). Official methods of analysis of the association of analytical chemists. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists. p. 3172
- Björklund HV, Bylund G. (1991). Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica* 21: 1511-1520
- Bligh EG, Dyer W J (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917
- Bravo S, Pozo V, Silva MT, et al (2013). Comparison of the fecundity rate of *Caligus rogercresseyi* infesting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) on farms in two regions of Chile. *Aquaculture* 404–405: 55–58
- Burrige L, Weis JS, Cabello F, et al (2010). Chemical use in salmon aquaculture : A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture* 306:7–23
- Commission Decision 2002/657 EC. Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results. 12 August 2002. Official Journal of the European Union, L 221/8-L 221/36.17.8
- Cho CY, Cowey CB, Watanabe T (1985). *Finfish nutrition in Asia: methodological approaches to research and development*. Ottawa: IDRC. pp. 154
- Choubert G, Noüe J, Lésel R (1991). Effects of dietary fat levels and of antibiotics (flumequina + gentamycin) on nutrient digestibility in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquat Living Resour* 4: 147–153
- Cravedi JP, Choubert G, Delous G (1987). Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. *Aquaculture* 60: 133–141
- Cyrino JEP, Bicudo AJA, et al (2010). A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. *Fish farming and the environment – the use of environmental friendly feeds in fish culture*. *R Bras de Zootec* 39:68–87
- FAO, 2016 Food and Agriculture Organization of the United Nation. *The State of World Fisheries and Aquaculture: 2016*. Fisheries and Agriculture Department. Rome
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. *FishStat Plus*. Fishery statistical collections. (Released: March 2017. Italy, Rome. Available at: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/en>)

- Ferreira CSG, Nunes BA, et al (2007). Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotoxicol Environ Saf* 67:452–458
- Gaikowski MP, Mushtaq M, Cassidy P, et al (2010). Depletion of florfenicol amine, marker residue of florfenicol, from the edible fillet of tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. niloticus* and *O. niloticus* x *O. aureus*) following florfenicol administration in feed. *Aquaculture* 301: 1–6
- Gominho-Rosa MC, Rodrigues APO, Mattioni B, et al (2015). Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources: Digestibility, enzyme activity and starch microstructure. *Aquaculture* 435:92–99
- Haygood AM, Jha R (2016). Strategies to modulate the intestinal microbiota of Tilapia (*Oreochromis* sp.) in aquaculture: A review. *Rev Aquacult* 0:1–14
- He S, Zhou Z, Liu Y, et al (2010). Effects of the antibiotic growth promoters flavomycin and florfenicol on the autochthonous intestinal microbiota of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ x *O. aureus* ♂). *Arch Microbiol* 192:985–994
- He S, Zhou Z, Liu Y (2012). Do dietary betaine and the antibiotic florfenicol influence the intestinal autochthonous bacterial community in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ x *O. aureus* ♂)? *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 28:785–791
- Henríquez-Núñez H, Evrard O, Kronvall G, Avendaño-herrera R (2012). Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. *Aquaculture* 354–355:38–44
- Kümmerer K (2009). Chemosphere Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* 75:417–434
- Leung TLF, Bates AE (2013). More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: Implications for food security. *J Appl Ecol* 50:215–222
- Li K, Liu L, Hedegaard J, et al (2016). Management measures to control diseases reported by tilapia (*Oreochromis* spp.) and whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmers in Guangdong, China. *Aquaculture* 457:91–99
- Lim J, Kim M, Hwang Y, et al (2010). Plasma and tissue depletion of florfenicol in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration. *Aquaculture* 307:71–74

- Liu W, Ming Y, Huang Z, Li P (2012). Plant physiology and biochemistry impacts of florfenicol on marine diatom *Skeletonema costatum* through photosynthesis inhibition and oxidative damages. *Plant Physiol Biochem* 60:165–170
- Martins A, Guimarães L, Guilhermino L (2013). Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to *Daphnia magna* assessed at two. *Environ Toxicol Pharmacol* 6:1022–1032
- Martinserp B, Horsberg TE, Varmab KJ, Sam R (1993). Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater at 11°C. *Aquaculture* 112: 1-11
- Mouly S, Lloret-Linares C, Sellier PO, et al (2017). Is the clinical relevance of drug-food and drug-herb interactions limited to grapefruit juice and Saint-John's Wort? *Pharmacol Res* 118:82–92
- Ng WK, Romano N (2013). A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. *Rev Aquacult* 5:220–254
- Norambuena L, Gras N, Contreras S (2013). Development and validation of a method for the simultaneous extraction and separate measurement of oxytetracycline, florfenicol, oxolinic acid and flumequine from marine sediments. *Mar Pollut Bull* 73:154–160
- NRC (2011) *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. Washington, DC: National Academies Press
- Park B, Lim J, Yun H (2006). Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in the Korean catfish (*Silurus asotus*). *J Vet Pharmacol Therap* 29:37–40
- Pouliquen H, Delepee R, Thorin C, et al (2009). Comparison of water, sediment, and plants for the monitoring of antibiotics: A case study on a river dedicated to fish farming. *Environ Toxicol Chem* 28: 496–502
- Ranjan A, Sahu NP, Gupta S (2017). Prospects of Medicated Feed in Aquaculture. *Nutr Food Sci Int J* 3:5-14
- Reda RM, Ibrahim RE, Ahmed ENG, El-Bouhy ZM (2013). Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *Egypt J Aquat Res* 39:241–248
- Rico A, Satapornvanit K, Haque MM, et al (2012). Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review. *Aquaculture* 4:75–93
- Rigos G, Alexis M, Nengas I (1999). Leaching, palatability and digestibility of oxytetracycline and oxolinic acid included in diets fed to seabass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquacult Res* 30:841–847

- Samuelsen OB, Bergh Ø, Ervik A (2003). Pharmacokinetics of florfenicol in cod *Gadus morhua* and in vitro antibacterial activity against *Vibrio anguillarum*. *Dis Aquat Org* 56:127–133
- Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev* 28:519–542
- Serrano, P.H (2005). Responsible use of antibiotics in aquaculture. Fisheries Technical Paper 469, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome
- Soto E, Endris RG, Hawke JP, et al (2010). In vitro and in vivo efficacy of florfenicol for treatment of *Francisella asiatica* infection in *Tilapia*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4664-4670
- Stoll C, Sidhu JPS, Tiehm A, Toze S (2012). Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia. *Environ Sci Technol* 46:9716-9726
- Uscanga A, Moyano FJ, Alvarez CA (2010) Assessment of enzymatic efficiency on protein digestion in the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem* 36:1079–1085 .
- WHO, Antimicrobial resistance: global report on surveillance. In World Health Organization, 2014. Electronic Citation. Accessed January 2018: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf)
- Zoccarato I, Gasco L, Calvi S. L, et al (1995). Effect of dietary avoparcin on performances and carcass composition in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacul Res* 26:361–366

CAPÍTULO VI  
DISCUSSÃO GERAL

O florfenicol é um dos antimicrobianos mais empregados na aquicultura, sendo usado pelos grandes produtores mundiais no tratamento de espécies de grande importância comercial, como tilápia, *catfish* e salmão. A falta de dados referente ao consumo global do fármaco dificulta uma avaliação precisa da extensão do impacto ambiental resultante do uso excessivo.

Na aquicultura asiática, responsável por aproximadamente 90% da produção mundial de peixe para consumo humano (FAO, 2016), o medicamento é aplicado no tratamento de furunculoses, vibrioses e estreptococose, enfermidades recorrentes no ciclo de produção (HE et al., 2012; LI et al., 2016; LIU et al., 2017; MO et al., 2017). De acordo com estudo realizado por Li e colaboradores (2016), aproximadamente um terço das 25 fazendas chinesas de tilápia investigadas apresentou pelo menos um surto de estreptococose entre os meses de julho a setembro de 2011.

A China é o maior produtor mundial de tilápia, com uma representatividade aproximada de 37%, seguida pelo Egito (15%), Filipinas (11%), Indonésia (8%) e Tailândia (7%). Os quatro países asiáticos produziram mais de 2,7 milhões de toneladas de tilápia-do-nylo em 2015 (FAO, 2017). Na aquicultura chinesa, o florfenicol é o segundo antimicrobiano mais consumido (XINHUA et al., 2012) e apesar de ser empregado em menor frequência nas Filipinas, Indonésia e Tailândia, o medicamento se encontra entre os cinco mais utilizados (SOMGA et al., 2012; RICO et al., 2013). No Vietnã, maior produtor mundial de *catfish*, com rendimento de 1,2 milhões de toneladas em 2015 (FAO, 2017), o uso de florfenicol esteve presente em 63% das 32 fazendas investigadas por Rico e colaboradores (2013) entre os anos de 2011 e 2012.

Diferente das culturas de tilápia e *catfish* dos países asiáticos, a venda e aplicação de florfenicol na salmonicultura, pelos dois maiores representantes comerciais da espécie, são bem estabelecidas. Em 2013 a aquicultura norueguesa consumiu aproximadamente 0,3 toneladas de florfenicol (NIPH, 2013), enquanto que no Chile o consumo no mesmo ano foi quase mil vezes maior. Em 2015 o emprego do fármaco foi ainda maior, correspondendo a 451 toneladas (SERNAPESCA, 2017).

Devido ao fato da maior parte da aquicultura desenvolvida pelos grandes produtores mundiais estar interligada a corpos de água circulante (BURRIDGE et al., 2010; VALLADÃO, 2016; RICO et al., 2012), somado a forma de administração preferencial de medicamento, via oral através da ração medicada, torna-se extremamente importante compreender e quantificar as perdas envolvidas no processo e seus interferentes.

Nosso estudo apontou que a lixiviação do florfenicol é significativamente ( $p < 0,05$ ) influenciada pelo veículo usado no recobrimento da ração (4 a 6 mm). O óleo vegetal mostrou-se mais eficiente em reter o fármaco em comparação com os demais veículos avaliados. Na condição mais branda (tempo de 5 minutos com temperatura da água a 22 °C) foi observada uma lixiviação de florfenicol de aproximadamente 8%, tendo um acréscimo de 5% na condição extrema (tempo de 15 minutos com temperatura da água a 28 °C). A pectina de BTM apresentou eficiência intermediária, mostrando lixiviação de 20% e 34% na melhor e pior condição analisada, respectivamente. O produto a base de CMC apresentou os piores resultados, sendo que mais da metade do fármaco (55%) lixiviado para água nos primeiros 5 minutos, tendo pouca variação entre as temperaturas e no tempo final do estudo (15 minutos), a perda se aproximou dos 60%.

A propriedade dos diferentes veículos em reter mais ou menos o fármaco na ração, parece estar relacionada com a polaridade do fármaco e sua maior ou menor afinidade pela água/veículo. O florfenicol apresenta baixa solubilidade em água (1,32 g L<sup>-1</sup> em pH 7,0) interagindo mais com compostos de média e baixa polaridade (FDA, 2005; WANG et al., 2011), ou seja, possui maior afinidade pelo veículo apolar. Além do mais, os géis formados pela pectina com BTM não são estáveis na água (PAOLUCCI et al., 2012), sendo as soluções poliméricas altamente polares, com a hidrofobicidade do CMC superior a da pectina com BTM (WALTER; TALOMIE, 1990).

Para avaliação da lixiviação do florfenicol em rações com diferentes granulometrias (1,3 a 1,5 mm, 1,8 a 2,0 mm, 2,6 mm, 3,4 mm e 4,0 mm) foi usado óleo vegetal como veículo. As rações com menor tamanho e, conseqüentemente maior superfície de contato em relação ao volume de ração, apresentam maior lixiviação, sendo a perda diminuída com o aumento do tamanho do pélete. Logo, a ração que apresentou menor perda foi a com 4 mm de diâmetro, sendo lixiviado em média 11% nos primeiros 5 minutos a 22 °C e 19% no final dos 15 minutos a 28 °C. Em contrapartida a ração com tamanho de 1,3 a 1,5 mm foi a que apresentou maior lixiviação, variado de 19% para 26% nas mesmas condições respectivamente.

Diante desses resultados, fica evidente o aumento da lixiviação com o aumento do tempo de exposição da ração na água e também com o aumento da temperatura. É importante lembrar que animais doentes geralmente levam mais tempo para ingerir o alimento, prolongando seu contato com água e conseqüentemente favorecendo a lixiviação. Em algumas condições testadas o intervalo de dez minutos de exposição da ração na água

resultou no dobro de lixiviação. E esses valores de lixiviação podem ser ainda maiores uma vez que, com exceção da salmonicultura que exige temperaturas mais baixas de criação (BRAVO et al., 2013; OPPEDAL et al., 2011), o medicamento é muitas vezes indicado para o tratamento de infecções causadas por patógenos oportunistas que atacam os animais principalmente durante o verão, quando a temperatura da água extrapola a observada nesse estudo (HE et al., 2012; LI et al., 2016; MO et al., 2017; SINDAN, 2017).

No sul da China, responsável por 90% da produção, a temperatura da água destinada a criação varia de 25 °C a 37 °C (YUAN et al., 2017; ZHANG et al., 2016), temperaturas muito semelhantes às encontradas na aquicultura das Filipinas (25 °C a 35 °C no verão) (BENTSEN et al., 2012) e Tailândia (28 °C a 31 °C) (KAYANSAMRUAJ et al., 2014). No Vietnã grande parte da produção de tilápia e catfish ocorre no rio Mekong em temperaturas que variam de 28 °C a 33 °C (THI et al., 2011; TRONG et al., 2013). No Brasil, os surtos causados por *S. agalactiae* são observados em todo país, sendo evidenciados em temperaturas acima de 27 °C até 31 °C (MIAN et al., 2009).

Embora o florfenicol possua tempo de meia vida curto (1,7 a 7,3 dias) (MARTINS et al., 2013), o uso recorrente garante sua presença na água. Na China, investigações ao longo do ano de 2010 do rio Huangpu, com 114 quilômetros de extensão, apontou a presença de florfenicol em 100% das 19 regiões avaliadas (JIANG et al., 2011). O mesmo ocorreu no maior rio do país, Yangtze, entre os anos de 2011 e 2013, o florfenicol esteve presente em todas as sete regiões avaliadas durante todas as estações do ano (YAN et al., 2013, ZHAO et al., 2010zon). Mais ao norte, próximo às fazendas de aquicultura, nos arredores de Dalian foi detectada a situação mais grave: a presença de florfenicol na água do mar atingiu concentrações na ordem de miligrama por litro (11000 µg L<sup>-1</sup>) (ZONG et al., 2010)

Os resíduos de antimicrobianos gerados pela aquicultura, somados com outras fontes de contaminação, podem resultar no desenvolvimento de bactérias resistentes (PRUDEN et al., 2014). No Chile, além da resistência de isolados de *F. psychrophilum*, procedentes de fazendas de salmão (HENRÍQUEZ-NÚÑEZ et al., 2012; MALDONADO et al., 2012), há relatos na literatura de resistência de diferentes espécies de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Citrobacter*, provenientes da água, sedimentos e alevinos (MIRANDA; ROJAS, 2007). A resistência ao florfenicol também já foi diagnosticada em bactérias isoladas de tilápia, truta arco-íris, *catfish* e de sedimentos provenientes de fazendas na Austrália



(AKINBOWALE et al., 2007), Estados Unidos (WELCH et al., 2009), França (GORDON et al., 2008) e Egito (ISHIDA et al., 2010).

Somados aos problemas de resistência bacteriana gerada pela presença de resíduos de florfenicol na água, estão os problemas relacionados ao desequilíbrio no ecossistema aquático. A exposição de resíduos de antimicrobianos na água pode afetar funções vitais, crescimento e reprodução de diversas espécies da microflora e a microfauna local (FERREIRA et al., 2007; MARTINS et. al 2013). Muitas vezes, esses organismos são fonte de alimento para outros animais do meio aquático (moluscos, peixes e crustáceos) e ainda, no caso das microalgas, são os primeiros produtores da cadeia alimentar e desempenham papel de fundamental importância na produção e equilíbrio de oxigênio dissolvido, (Lei et al., 2009; MARTINS; GUIMARÃES; GUILHERMINO, 2013), ou seja, exercem papel trófico significativo e, dessa forma, mudanças na composição das espécies ou na biomassa podem resultar em respostas potenciais ao ecossistema (LIU et al., 2012).

Ao avaliar a digestibilidade aparente do fármaco após ingestão da ração medicada, verificamos que 4% não são absorvidos pelo animal (nas condições avaliadas) sendo eliminado com as fezes de forma inalterada. Não é de nosso conhecimento estudos que tenham quantificado a digestibilidade do florfenicol em peixes. Rigos e colaboradores (1999) estudaram a digestibilidade de oxitetraciclina e ácido oxolínico em seabass (*Dicentrarchus labrax L*), em duas temperaturas distintas (16 °C e 24 °C). Para essa espécie, o ácido oxolínico é mais eficiente do que a oxitetraciclina, sendo a digestibilidade dos fármacos influenciada pela temperatura. Ambos foram altamente absorvidos em 24 °C (94% e 85%, respectivamente), com perda aproximada de um terço ao reduzir a temperatura para 16 °C (64% e 59%, respectivamente).

Se por um lado estudos que determinem a digestibilidade do florfenicol são escassos, por outro é possível encontrar estudos que avaliam sua biodisponibilidade, ou seja, a porção do conteúdo total do fármaco ingerida que atinge a circulação sistêmica (AGORAM et al., 2001). Esses valores são determinados no sangue após administração de dose única do fármaco por via oral ou intravenosa (RANJAN et al., 2017) e variam com as espécies estudadas. Segundo Samuelson e colaboradores (2003) a biodisponibilidade do florfenicol, após administração via gavagem de ração medicada (10 mg kg<sup>-1</sup>) em cod *Gadus morhua* é de 91%. Para o Atlantic salmon (*Salmo salar*), Martinserp e colaboradores (1993) relatam um valor de 96% após administração de ração na mesma concentração, enquanto que em Korean catfish (*Silurus asotus*) a biodisponibilidade encontrada por Park e colaboradores (2006) foi

de 93% após a introdução de 20 mg kg<sup>-1</sup> por via oral. Não é de nosso conhecimento estudos que avaliaram a biodisponibilidade do florfenicol em tilápia-do-nilo.

O florfenicol possui características lipofílicas que lhe proporcionam boa penetração nos tecidos (SCHWARZ et al., 2004), além de possuir alto valor de pKa (9,0), característica que impede a ionização das moléculas do fármaco no pH estomacal facilitando a absorção pelo epitélio intestinal (LIM et al., 2010). A variação da concentração de fármaco absorvida também está relacionada às condições inerentes a espécie estudada. A tilápia possui coeficiente intestinal relativamente alto (6,26) e, quanto maior o comprimento do intestino, mais tempo o fármaco fica em contato com a parede intestinal, proporcionando melhor absorção (GOMINHO-ROSA et al., 2015).

A presença do fármaco na ração aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a digestibilidade aparente de proteína e energia bruta. Segundo dados da literatura, a promoção do crescimento, viabilizado pela administração de antimicrobianos, não está totalmente esclarecida (FAO, 2016). Porém como as bactérias intestinais podem inativar enzimas pancreáticas e metabolizar proteínas da dieta, acredita-se que os antimicrobianos administrados em subdosagens terapêuticas possam promover uma seleção nesses microrganismos, favorecendo a absorção de nutrientes e, conseqüentemente, resultando em aumento da digestibilidade proteica (SERRANO, 2005).

A redução da comunidade bacteriana intestinal autóctone de tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus* ♀ x *O. aureus* ♂) foi evidenciada por He e colaboradores (2012), após administração (por 8 semanas) de ração extrusada com florfenicol (0,002% m/m). Em outro estudo, ao avaliar a administração do fármaco (10 e 20 mg kg<sup>-1</sup> por 8 semanas) em tilápias híbridas, verificou-se a redução na população de duas espécies de cianobactérias, que têm por característica estocar grande quantidade de alimento (HE et al., 2010). A utilização do fármaco como promotor de crescimento em tilápia-do-nilo (*O. niloticus*) foi estudada por Reda e colaboradores (2013). Após 12 semanas de administração de ração medicada com florfenicol (5 mg kg<sup>-1</sup>), houve aumento significativo de peso. Estudos nos tecidos epiteliais da parede intestinal mostraram uma redução de sua espessura, o que poderia ter contribuído para maior absorção dos nutrientes e conseqüentemente maior aumento do peso.

A energia necessária para o desenvolvimento e crescimento é proveniente dos nutrientes ingeridos pelo animal (HAIDAR et al., 2016). Na criação da tilápia o custo relacionado com a alimentação pode representar de 45 a 85% da produção (NG AND HANIM, 2007), sendo os aminoácidos a porção mais cara da dieta (NG AND ROMANO,

2013). Aproximadamente 65 a 75% da massa dos peixes é composta de proteína (GERMAN, 2011) que, juntamente com os lipídeos, são os macronutrientes mais importantes para formação dos tecidos corporais (CYRINO et al., 2010), ou seja, melhorar a eficiência da conversão alimentar reduz custo de produção. Porém, a economia gerada é irrisória perto da perda econômica em longo prazo.

O uso prolongado de antimicrobianos em subdosagens terapêutica pode aumentar a incidência de resistência bacteriana (FAO, 2016). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, os problemas gerados pela resistência bacteriana consomem mais de 34 bilhões de dólares somente nos Estados Unidos (WHO, 2014). Na União Europeia o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento está proibido desde 2006 e, desde então, a resistência bacteriana tem sido reduzida (FAO, 2016). O ambiente aquático funciona como um reservatório de genes resistentes (STOLL et al., 2012), podendo ser uma fonte direta e indireta de propagação, afetando não só os animais aquáticos, como também podendo ser ingerida por animais terrestres e pelo homem, ou ainda ser usada para irrigação de lavouras (FAO, 2016).

No Chile a infecção causada pela bactéria *Flavobacterium psychrophilum* gera grandes perdas econômicas desde 1993. Com a introdução de novos antimicrobianos como oxitetraciclina e mais recentemente o florfenicol, os surtos foram controlados. Porém, o emprego inapropriado já resultou no desenvolvimento de genes resistentes. Ao avaliar a resistência bacteriana de 40 isolados de *F. psychrophilum* provenientes de fazendas chilenas de salmão, pesquisadores relatam que 92,5% dos isolados apresentaram resistência ao florfenicol (HENRÍQUEZ-NÚÑEZ et al., 2012).

Alguns produtores, ao notarem que a dosagem terapêutica não exerce o efeito esperado aumentam a dose do fármaco (BRAVO, 2012; LI et al., 2016). A consequência na conversão alimentar pode ser contrária ao efeito promotor de crescimento. Segundo estudo realizado por Gaikowski e colaboradores (2013), a administração de dosagem de 45 mg kg<sup>-1</sup> e 75 mg kg<sup>-1</sup> por vinte dias consecutivos, em tilápia-do-nilo, provocou uma redução do crescimento em 16% e 23%, respectivamente, em relação aos animais que receberam a dieta controle (sem o fármaco), além de reduzir significativamente a palatabilidade com consumo de 37,5% a menos na dosagem de 45 mg kg<sup>-1</sup> e 44,7% na dosagem de 45 mg Kg<sup>-1</sup>.

Estudos farmacocinéticos em diversas espécies demonstraram que o florfenicol apresenta rápida absorção, com boa distribuição pelo organismo, atingindo os órgãos alvos em concentração superior a concentração mínima inibitória (MIC) para diversos patógenos

(FENG et al., 2016, 2008; FENG AND JIA, 2009; LIM et al., 2010; MARTINSERP et al., 1993; PARK et al., 2006; SAMUELSEN et al., 2003; YANG et al., 2013). Entretanto nesses estudos a administração é feita pela introdução do fármaco diretamente no esôfago, desconsiderando as perdas ocorridas durante o preparo e lixiviação.

## Referências

- AKINBOWALE, O. L.; PENG, H.; BARTON, M. D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology**. v. 100, p. 1103–1113, 2007.
- BENTSEN, H.B. et al. Genetic improvement of farmed tilapias: Genetic parameters for body weight at harvest in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during five generations of testing in multiple environments. **Aquaculture**, v. 338–341, p. 56–65, 2012.
- BRAVO, S. et al. Comparison of the fecundity rate of *Caligus rogercresseyi* infesting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) on farms in two regions of Chile. *Aquaculture*, v. 404–405, p. 55–58, 2013.
- BURRIDGE, L. et al. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**. v. 306, n. 1–4, p. 7–23, 2010.
- 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 2016 (Food and Agriculture Organization). The state of world fisheries and aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 2016.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. FishStat Plus. Fishery statistical collections. (Released: March 2017. Italy, Rome. Available at: [www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/en](http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/en)
- FDA (Food and drug Administration), 2004. Environmental Assessment for Aquaflor® 50% Type A Medicated Article for *Catfish*. Disponível em: <<https://animaldrugsatfda.fda.gov/adafda/app/search/public/document/downloadEA/110> >. Acesso em abril de 2018.
- FENG, J.; HUANG R.; LIU, P.; DONG, D. Pharmacokinetics of florfenicol and behavior of its metabolite florfenicol amine in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) after oral dose administration. **Journal of fish diseases**. v. 39, p. 833- 843, 2016.

- FENG, J.; JIA, X. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) held in freshwater at 22 °C. **Aquaculture**. v. 289, n. 1–2, p. 129–133, 2009.
- FENG, J.; JIA, X.; LI, L. Tissue distribution and elimination of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O caureus*) after a single oral administration in freshwater and seawater at 28 °C. **Aquaculture**. v. 276, p. 29-35, 2008.
- FERREIRA, C. S. G.; NUNES, B. A.; ENRIQUES-ALMEIDA, J. M. M.; GUILHERMINO, L. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 67, p. 452-458, 2007.
- GAIKOWSKI, M. P. et al. Depletion of florfenicol amine, marker residue of florfenicol, from the edible fillet of tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. niloticus* and *O. niloticus* x *O. aureus*) following florfenicol administration in feed. **Aquaculture**. v. 301, n. 1–4, p. 1–6, 2010.
- GERMAN, D. P. **Food acquisition and digestion | Digestive Efficiency**. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 3.
- GOMINHO-ROSA, M. DO C. et al. Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources: Digestibility, enzyme activity and starch microstructure. **Aquaculture**, v. 435, p. 92–99, 2015.
- GORDON, L. et al. Complete sequence of the floR-carrying multiresistance plasmid pAB5S9 from freshwater *Aeromonas bestiarum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 62, n. 1, p. 65–71, 2008.
- H Aidar, M. N. et al. The effect of type of carbohydrate (starch vs. nonstarch polysaccharides) on nutrients digestibility, energy retention and maintenance requirements in Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 463, p. 241–247, 2016.
- HE, S. et al. Effects of the antibiotic growth promoters flavomycin and florfenicol on the autochthonous intestinal microbiota of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ x *O. aureus* ♂). **Arch Microbiol**. p. 985–994, 2010.
- HE, S.; ZHOU, Z.; LIU, Y. Do dietary betaine and the antibiotic florfenicol influence the intestinal autochthonous bacterial community in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ x *O. aureus* ♂)? **World Journal of Microbiology Biotechnology**. v. 28, p. 785–791, 2012.

- HENRÍQUEZ-NÚÑEZ, H. et al. Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. **Aquaculture**. v. 354–355, p. 38–44, 2012.
- ISHIDA, Y. et al. Molecular analysis of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 72, p. 727–734, 2010.
- JIANG, L. et al. Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu. **Chemosphere**. v. 82, n. 6, p. 822–828, 2011.
- KAYANSAMRUAJ, P. et al. Molecular characterization and virulence gene profiling of pathogenic *Streptococcus agalactiae* populations from tilapia (*Oreochromis* sp) farms in Thailand. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, n. 4, p. 488–495, 2014.
- LAI, H.; HOU, J., SU, C.; CHEN, C. Effects of chloramphenicol , florfenicol , and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 329–334, 2009.
- LI, K. et al. Management measures to control diseases reported by tilapia (*Oreochromis spp.*) and whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmers in Guangdong, China. **Aquaculture**. v. 457, p. 91–99, 2016.
- LIM, J. et al. Plasma and tissue depletion of florfenicol in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration. **Aquaculture**. v. 307, n. 1–2, p. 71–74, 2010.
- LIU, W. et al. Plant physiology and biochemistry impacts of florfenicol on marine diatom *Skeletonema costatum* through photosynthesis inhibition and oxidative damages. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 60, p. 165–170, 2012.
- LIU, X.; CALEB, J.; MENG, X. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: A review. **Environmental Pollution**. v. 223, p. 161–169, 2017.
- MALDONADO, M. A. et al. Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. **PLoS ONE**. v. 7, n. 8, p. 26–28, 2012.
- MARTINS, A.; GUIMARÃES, L.; GUILHERMINO, L. Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to *Daphnia magna* assessed at two temperatures. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.36, p. 1022–1032, 2013.
- MARTINSERP, B. et al. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater at 11 °C. **Aquaculture**. v. 112, p. 1-11, 1993.
- MIAN, G. F. et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in

- Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1–2, p. 180–183, 2009.
- MIRANDA, C. D.; ROJAS, R. Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage. **Aquaculture**. v. 266, p. 39–46, 2007.
- MO, W. Y. et al. Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks. **Environmental Science Pollution Research**. v. 24, p. 8978–8989, 2017.
- NG, W. K.; HANIM, R. Performance of genetically improved Nile tilapia compared with red hybrid tilapia fed diets containing two protein levels. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 9, p. 965–972, 2007.
- NG, W. K.; ROMANO, N. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, n. 4, p. 220–254, 2013.
- NIPH, 2017. Norwegian Institute of Public Health. Increased use of medicines in Norwegian fish farming. Disponível em <<https://www.fhi.no/en/hn/drug/fisk/increased-use-of-medicines-in-norwe/>>. Acessado em: janeiro 2018.
- OPPEDAL, F.; DEMPSTER, T.; STIEN, L. H. Environmental drivers of Atlantic salmon behaviour in sea-cages: A review. **Aquaculture**, v. 311, n. 1–4, p. 1–18, 2011.
- PAOLUCCI, M. et al. Development of Biopolymers as Binders for Feed for Farmed Aquatic Organisms. **Aquaculture**, p. 3–35, 2012.
- PARK, B.; LIM, J.; YUN, H. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in the Korean catfish (*Silurus asotus*). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 29, p. 37–40, 2006.
- PRUDENT, A. Balancing water sustainability and public health goals in the face of growing concerns about antibiotic resistance. **Environment Science Technology**. v.48, p. 5-14, 2014.
- RANJAN, A.; SAHU, N. P.; GUPTA, S. Prospects of Medicated Feed in Aquaculture. **Nutrition Food Science International Journal**, v. 3, p. 5-14, 2017.
- REDA, R. M.; IBRAHIM, R. E.; AHMED, E. N. G.; EL-BOUHY, Z. M. Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 39, p. 241–248, 2013.
- RICO, A.; SATAPORNVANIT, K.; HAQUE, M. M.; MIN, M.; NGUYEN, T. N.; TELFER,

- T. C.; BRINK, P. J. V. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risk: a critical review. **Aquaculture**. v. 4, p.735-93, 2012.
- RIGOS, G.; ALEXIS, M.; NENGAS, I. Leaching, palatability and digestibility of oxytetracycline and oxolinic acid included in diets fed to sea bass *Dicentrarchus labrax* L. **Aquaculture Research**. v.30, p. 841-847, 1999.
- SAMUELSEN, O. B.; BERGH, Ø.; ERVIK, A. Pharmacokinetics of florfenicol in cod *Gadus morhua* and in vitro antibacterial activity against *Vibrio anguillarum*. **Dis Aquat Org** v. 56, p. 127–133, 2003.
- SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 28, p. 519- 542, 2004.
- SERNAPESCA, 2017. Servicio Nacional de Pesca y acuicultura. Gobierno del Chile Fiscalización en pesca y acuicultura\_ Informe de actividades del año 2016. Disponible em: < [http://www.sernapesca.cl/presentaciones/DN/SERNAPESCA\\_IFPA\\_2016.pdf](http://www.sernapesca.cl/presentaciones/DN/SERNAPESCA_IFPA_2016.pdf)>. Acceso em abril de 2018.
- SERRANO, P.H. Responsible use of antibiotics in aquaculture. Fisheries Technical Paper 469, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, 2005.
- SINDAN, 2017. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal \_ Compêndio de Produtos veterinários. Disponible em: < <http://www.cpv.com.br/cpv/>>. Acceso em abril de 2018.
- SOMGA, S. S., SAMGA, J. R. AND REGIDOR, S. E., 2012. O Use of veterinary medicines in Philippine aquaculture: current status. In: M.G. Bondad-Reantaso, J.R. Arthur & R.P. Subasinghe, eds. Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production, p. 69-82. FAO Fisheries Technical Paper N° 547. Rome, FAO. 207 pp.
- STOLL, C.; SIDHU, J. P. S.; TIEHM, A.; TOZE, S. Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water sample collected from Germany and Australia. **Environment Science Technology**. v.46, p. 9716-9726, 2012.
- THI, P. et al. Science of the Total Environment Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. **Science of the Total Environment**. v. 409, n. 15, p. 2894–2901, 2011.
- TRONG, T. Q. et al. Heritability and genotype by environment interaction estimates for



- harvest weight, Growth rate, And shape of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) grown in river cage and VAC in Vietnam. **Aquaculture**, v. 384–387, p. 119–127, 2013.
- VALLADÃO, G., GALLANI, S., PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Rev. Aquac.** p.1–19, 2016.
- WALTER, R. H.; TALOMIE, T. G. Quantitative definition of polysaccharide hydrophilicity. **Food Hydrocolloids**, v. 4, n. 3, p. 197–203, 1990.
- WANG, S.; CHEN, N.; QU, Y. Solubility of florfenicol in different solvents at temperatures from (278 to 318) K. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 56, n. 3, p. 638–641, 2011.
- WELCH, T. J. et al. IncA/C plasmid-mediated florfenicol resistance in the catfish pathogen *Edwardsiella ictaluri*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 845–846, 2009.
- WHO, Antimicrobial resistance: global report on surveillance. In World Health Organization, 2014. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf). Acesso em abril de 2018.
- XINHUA, Y.; WEN, C. Use of veterinary medicines in Chinese aquaculture: current status. Retirado de FAO (Food and Agriculture Organization). Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. p. 51-67, 2012.
- YAN, C. et al. Antibiotics in the surface water of the Yangtze Estuary: Occurrence, distribution and risk assessment. **Environmental Pollution**, v. 175, p. 22–29, 2013.
- YANG, Q.; XIE, L.; WU, Z.; CHEN, X.; YANG, Y.; LIU, J.; ZHANG, Q. Pharmacokinetics of florfenicol after oral dose administration in Yellow Catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. **Journal of the world aquaculture society**. v. 44, p. 586- 592, 2013.
- YUAN, Y. et al. Economic profitability of tilapia farming in China. **Aquaculture International**, v. 25, n. 3, p. 1253–1264, 2017.
- ZHANG, J.S., LI, Z.J., WEN, G.L., WANG, Y.L., LUO, L., ZHANG, H.J., DONG, H.B.. Relationship between white spot syndrome virus (WSSV) loads and characterizations of water quality in *Litopenaeus vannamei* culture ponds during the tropical storm. *Int. J. Vet. Res.* 17, 210–214, 2016.
- ZHAO, L.; DONG, Y. H.; WANG, H. Science of the Total Environment Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China.

**Science of the Total Environment**, v. 408, n. 5, p. 1069–1075, 2010.

ZONG, H.; MA, D.; WANG, J. Research on Florfenicol Residue in Coastal Area of Dalian ( Northern China ) and Analysis of Functional Diversity of the Microbial Community in Marine Sediment. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**. v.84, p. 245–249, 2010

CAPÍTULO VII  
CONCLUSÃO GERAL

O crescimento global da aquicultura nas últimas décadas e conseqüentemente o aumento da produção e consumo de pescado tem sido denominado por alguns autores de “revolução azul”. O termo é uma referência à revolução verde sofrida na agricultura na década de 1950, quando o aumento da produção agrícola foi fortemente impulsionado através de incentivos governamentais, uso de agrotóxicos, melhoramento genético e mecanização, com o intuito de sanar o problema da fome. Porém, do mesmo modo que a revolução verde resultou em danos ecológicos e ambientais, a revolução azul tende a seguir o mesmo caminho.

O uso dos recursos aquáticos exige cautela. As formas predominantes de produção fazem uso excessivo de antimicrobianos e, na maior parte das vezes, de forma indiscriminada. Poucos estudos que avaliam a quantidade de fármaco perdida para o meio ambiente, proveniente da prática da aquicultura, estão disponíveis na literatura. Apesar de o florfenicol ser um dos dois antimicrobianos mais consumidos na aquicultura mundial, ainda não havia sido determinada a quantidade do fármaco perdida através do processo de lixiviação a partir da ração medicada, em diferentes condições, antes da ingestão pelo animal.

Os resultados encontrados em nosso estudo demonstraram que a temperatura e tempo de exposição na água afetam significativamente a lixiviação do florfenicol. Ao comparar duas temperaturas distintas, o fármaco lixivia mais na temperatura mais elevada e a perda é progressiva com o tempo. Entretanto a variação do pH na faixa de 4,5 e 8,0 não interfere na perda. A forma de veicular o medicamento na ração também influencia na lixiviação, assim como o tamanho do *pellet*. O recobrimento com CMC é o menos eficaz em reter o fármaco na ração, mostrando uma lixiviação do florfenicol de aproximadamente 55% após 5 minutos de exposição a 28 °C. Por outro lado, na ração recoberta com óleo vegetal a perda nessa mesma condição é de aproximadamente 10%, apresentando o melhor resultado. Não houve diferença significativa dentre as duas concentrações pectina com BTM avaliadas (1.5% e 3%), exibindo extravio intermediário de aproximadamente 30% nas condições mencionadas anteriormente.

O estudo da lixiviação do florfenicol presente em *pellets* de diferentes tamanhos revelou que as rações com menor diâmetro apresentam maior lixiviação, sendo a perda diminuída com o aumento do tamanho. A ração que apresentou menor perda foi a com 4 mm de diâmetro, sendo lixiviado em média 14% nos primeiros 5 minutos a 28 °C. Em contrapartida, a ração com tamanho de 1,3 a 1,5 mm foi a que apresentou maior lixiviação, com extravio de 23% nessas condições.

Diante desses resultados podemos estimar que grande quantidade de florfenicol está sendo lançada nos canais aquíferos anualmente. Como em grande parte dos países produtores o controle e fiscalização sobre a aplicação de antimicrobianos e descarte de efluentes é falho, o uso recorrente de florfenicol tem garantido sua permanência no meio aquático de diversos locais do mundo, mesmo sua degradação sendo relativamente rápida e não apresentando potencial de bioacumulação.

Somando ao estudo de lixiviação, quantificamos através de um estudo inédito da digestibilidade aparente do florfenicol, a porção do medicamento que é eliminada de forma inalterada nas fezes após a ingestão da ração medicada por tilápia-do-nilo, a segunda espécie mais produzida mundialmente e a primeira no *ranking* nacional. Nesse estudo podemos observar a interferência do medicamento na absorção de nutrientes pelo animal.

Os resultados mostraram que o coeficiente de digestibilidade aparente do florfenicol para a espécie nas condições estudadas é de 96%, ou seja, apenas 4% não são absorvidos pelo animal, atingindo as fezes de forma inalterada. A presença do fármaco, na concentração de 0,1% na ração, aumentou significativamente a digestibilidade da proteína e energia bruta. Porém, devemos ressaltar que o uso de antimicrobianos como promotor de crescimento pode contribuir para os danos ambientais e resistência bacteriana.

Sem dúvida o crescimento da aquicultura não seria possível sem a utilização de fármacos veterinários. Entretanto, seu uso deve ser feito de forma racional e controlada. Dessa maneira podemos minimizar e até mesmo evitar a intoxicação das espécies, dos produtores e do ambiente bem como garantir a segurança alimentar e reduzir a resistência de microrganismos. Um grande desafio está pela frente: fornecer alimentos de boa qualidade nutricional para sustentar a crescente população mundial de forma sustentável, causando o menor impacto ambiental possível. Assim, sugere-se a realização de estudos adicionais com outros fármacos e outros agentes de recobrimento da ração medicada para avaliar o grau de lixiviação do fármaco, assim como com outras espécies de peixes para avaliar o efeito do fármaco em aspectos nutricionais no peixe. Não menos importante, é a necessidade de avaliar a ecotoxicidade decorrente da lixiviação do fármaco no ambiente, assim como a indução de resistência microbiana.

CAPÍTULO VIII  
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADILSON, E. et al. UPLC-MS/MS determination of florfenicol and florfenicol amine antimicrobial residues in tilapia muscle. **Journal of Chromatography B**, v. 1035, p. 8–15, 2016.
- AGORAM, B.; WOLTOSZ, W. S.; BOLGER, M. B. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. *Advanced drug delivery reviews*, v. 50 Suppl 1, p. S41–S67, 2001.
- AKINBOWALE, O. L. et al. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 30, n. 2, p. 177–182, 2007.
- ALDAY-SANZ, V.; CORSIN, F.; IRDE, E. BONDAD-REANTASO, M. G. Survey on the use of veterinary medicines in aquaculture. *Retirado de FAO (Food and Agriculture Organization) Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production*. p. 29-44, 2012.
- AOAC. (2002). *Official methods of analysis of the association of analytical chemists*. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists. pp. 937.
- ARCANGIOLI, M. A; LEROY-SÉTRIN, S.; MARTEL, J. L.; CHASLUS-DANCLA, E. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. **FEMS Microbiology Letters**. v. 174, 1999.
- BENTSEN, H.B. et al. Genetic improvement of farmed tilapias: Genetic parameters for body weight at harvest in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during five generations of testing in multiple environments. **Aquaculture**, v. 338–341, p. 56–65, 2012.
- BINH, V.N., DANG, N., ANH, N.T.K., KY, L.X., THAI, P.K., Antibiotics in the aquatic environment of Vietnam: Sources, concentrations, risk and control strategy, **Chemosphere**, 2018.
- BOLTON, L. F. et al. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* Serotype *typhimurium* DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, n. 5, p. 1348–1351, 1999.
- BOSTOCK, J. et al. Aquaculture: global status and trends. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, p. 2897–2912, 2010.
- BOXALL, A.B.A.; FOGG, L.A.; BAIRD, D.J.; LEWIS, C.; TELFER, T.C.; KOLPIN, D.; RAVELL, A. Targeted monitoring study for veterinary medicines in the UK environment. Final Report to the UK Environmental Agency. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, p. 1348-1351, 2005.
- BRAVO, S. Environmental impacts and management of veterinary medicines in aquaculture:

- the case of salmon aquaculture in Chile. Retirado de FAO (Food and Agriculture Organization). Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. p. 11-24, 2012.
- BRAVO, S. et al. Comparison of the fecundity rate of *Caligus rogercresseyi* infesting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) on farms in two regions of Chile. *Aquaculture*, v. 404–405, p. 55–58, 2013.
- BURRIDGE, L. et al. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. ***Aquaculture***. v. 306, n. 1–4, p. 7–23, 2010.
- 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, 2006.
- CABEZA, Y. et al. Monitoring the occurrence of emerging contaminants in treated wastewater and groundwater between 2008 and 2010. The Baix Llobregat (Barcelona , Spain). ***Journal of Hazardous Materials***. v. 240, p. 32–39, 2012.
- CAIPANG, C. M. A. In vivo modulation of immune response and antioxidant defense in Atlantic cod, *Gadus morhua* following oral administration of oxolinic acid and florfenicol. ***Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology***, v. 150, p. 459–464, 2009.
- CHO, C. Y., COWEY, C. B., & WATANABE, T. Finfish nutrition in Asia: methodological approaches to research and development. Ottawa: IDRC. pp. 154, 1985.
- CHOUBERT, G., DE LA NOÛE, J., & LÉSEL, R. Effects of dietary fat levels and of antibiotics (flumequina + gentamycin) on nutrient digestibility in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). ***Aquatic Living Resources***, v.4, p. 147–153, 1991.
- CHRISTENSEN, A. M.; INGERSLEV, F.; BAUN, A. Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. ***Environmental Toxicology and Chemistry***. v. 25, n. 8, p. 2208–2215, 2006.
- HAYES, J. Determination of florfenicol in fish feeds at high inclusion rates by HPLC-UV. ***Journal of AOAC International***, v. 96, p. 7–12, 2013.
- CRAVEDI, J. P.; CHOUBERT, G.; DELOUS, G. Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. ***Aquaculture***, v. 60, n. 2, p. 133–141, 1987.
- 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.



- DEFOIRDT, T.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 251–258, 2011.
- DIANA, J. S. Aquaculture production and biodiversity conservation. **Bioscience**. v. 59, p. 27–38, 2009.
- DONE, H. Y.; VENKATESAN, A. K.; HALDEN, R. U. Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture? **The AAPS Journal**. v. 17, n. 3, p. 513–524, 2015.
- DUIS, K. et al. Leaching of four different antibacterial from oil and alginate coated fish feed pellets. **Aquaculture Research**. v. 26, p.549-559, 1995.
- EC, 2002. Commission Decision 2002/657 EC. Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results. 12 August 2002. Official Journal of the European Union, L 221/8-L 221/36.17.8.
- EGUCHI, K. et al. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. **Chemosphere**. v. 57, p. 1733–1738, 2004.
- EU, 2010. Council Regulation (EU) No. 37/2010 of 22 December 2009, on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off. J. Eur. Commun. L 15/1, 20.01.2010.
- FAIS, A. P. et al. LC-MS/MS methods for sulfadimethoxine and ormetoprim analysis in feed and fish fillet and a leaching study for feed after alternative procedures for the incorporation of drugs. **Food Additives & Contaminants: Part A**. v. 34, n° 4, p. 501–508, 2017.
- FAO 2005 (Food and Agriculture Organization). Responsible use of antibiotics in aquaculture. Rome, 2005.
- FAO 2006 (Food and Agriculture Organization). Updating principles and methods of risk assessment. Rome, 2006.
- FAO 2012 (Food and Agriculture Organization). The state of world fisheries and aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 2012.
- FAO 2014 (Food and Agriculture Organization). Food and Nutrition in numbers. Rome, 2014.
- FAO 2016 (Food and Agriculture Organization). The state of world fisheries and aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 2016.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. FishStat Plus. Fishery statistical collections. (Released: March 2017. Italy, Rome. Available at: [www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/en](http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/en)

- FDA (Food and drug Administration), 2004. Environmental Assessment for Aquaflor® 50% Type A Medicated Article for *Catfish*. Disponível em: <<https://animaldrugsatfda.fda.gov/adafda/app/search/public/document/downloadEA/110> >. Acesso em abril de 2018.
- FDA (Food and drug Administration), 2015. Freedom of information summary, supplemental new animal drug application. NADA 141-256 AQUAFLOLOR.
- FENG, J.; HUANG R.; LIU, P.; DONG, D. Pharmacokinetics of florfenicol and behavior of its metabolite florfenicol amine in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) after oral dose administration. **Journal of fish diseases**. v. 39, p. 833- 843, 2016.
- FENG, J.; JIA, X. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) held in freshwater at 22 °C. **Aquaculture**. v. 289, n. 1–2, p. 129–133, 2009.
- FENG, J.; JIA, X; LI, L. Tissue distribution and elimination of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O caureus*) after a single oral administration in freshwater and seawater at 28 °C. **Aquaculture**. v. 276, p. 29-35, 2008.
- FERREIRA, C. S. G.; NUNES, B. A.; ENRIQUES-ALMEIDA, J. M. M.; GUILHERMINO, L. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 67, p. 452-458, 2007.
- FERREIRA, C. S. G.; NUNES, B. A.; ENRIQUES-ALMEIDA, J. M. M.; GUILHERMINO, L. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 67, p. 452-458, 2007.
- GAIKOWSKI, M. P. et al. Depletion of florfenicol amine, marker residue of florfenicol, from the edible fillet of tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. niloticus* and *O. niloticus* x *O. aureus*) following florfenicol administration in feed. **Aquaculture**. v. 301, n. 1–4, p. 1–6, 2010.
- GAO, L. et al. Occurrence, distribution and bioaccumulation of antibiotics in the Haihe. **Journal of Environmental Monitoring**. v. 14, p. 1248–1255, 2012.
- GARCÍA-GALÁN, M. J. et al. Simultaneous occurrence of nitrates and sulfonamide antibiotics in two ground water bodies of Catalonia (Spain). **Journal of Hydrology**. v. 383, n. 1–2, p. 93–101, 2010.
- GERMAN, D. P. **Food acquisition and digestion | Digestive Efficiency**. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 3.

- GOLET, E. M. et al. Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical Chemistry**. v. 73, n. 15, p. 3632–3638, 2001.
- GOMINHO-ROSA, M. DO C. et al. Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources: Digestibility, enzyme activity and starch microstructure. **Aquaculture**, v. 435, p. 92–99, 2015.
- GONZALO, S. et al. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. **Water Research**. v. 7 p. 2050-2064, 2013.
- GORDON, L. et al. Complete sequence of the floR-carrying multiresistance plasmid pAB5S9 from freshwater *Aeromonas bestiarum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 62, n. 1, p. 65–71, 2008.
- GRACIA-LOR, E.; SANCHO, J. V; HERNÁNDEZ, F. Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1218, p. 2264–2275, 2011.
- GULLBERG, E.; CAO, S.; BERG, O.G.; IIBACK, C.; SANDEGREN, L.; HUGHES, D.; ANDERSSON, D. I. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentration. **Plos Pathogens**. v. 7, p. 1-9, 2011.
- H Aidar, M. N. et al. The effect of type of carbohydrate (starch vs. nonstarch polysaccharides) on nutrients digestibility, energy retention and maintenance requirements in Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 463, p. 241–247, 2016.
- HAYES, J. Determination of florfenicol in fish feeds at high inclusion rates by HPLC-UV. **Journal of AOAC International**. v. 96, p. 1-7, 2013.
- HAYGOOD, A. M.; JHA, R. Strategies to modulate the intestinal microbiota of Tilapia (*Oreochromis sp.*) in aquaculture: A review. **Reviews in Aquaculture**, p. 1–14, 2016.
- HE, S. et al. Effects of the antibiotic growth promoters flavomycin and florfenicol on the autochthonous intestinal microbiota of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ x *O. aureus* ♂). **Arch Microbiol**. p. 985–994, 2010.
- HE, S.; ZHOU, Z.; LIU, Y. Do dietary betaine and the antibiotic florfenicol influence the intestinal autochthonous bacterial community in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ x *O. aureus* ♂)? **World Journal of Microbiology Biotechnology**. v. 28, p. 785–791, 2012.

- HE, Z. et al. Pharmaceuticals pollution of aquaculture and its management in China. **Journal of Molecular Liquids**. v. 223, p. 781–789, 2016.
- HENRÍQUEZ-NÚÑEZ, H. et al. Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. **Aquaculture**. v. 354–355, p. 38–44, 2012.
- HEUER, O. E. et al. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. **Food Safety**. v. 49, p. 11–16, 2009.
- HIRSCH, R. et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of The Total Environment**. v.225, p. 109–118, 1999.
- HOSSAIN, A.; NAKAMICHI, S.; TANI, K. Occurrence, distribution, ecological and resistance risks of antibiotics in surface water of finfish and shell fish aquaculture in Bangladesh. **Chemosphere**. v. 188, p. 329–336, 2017.
- IBGE, 2015. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa\\_resultados.php?id\\_pesquisa=21](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=21)>. Acesso em abril de 2018.
- ISHIDA, Y. et al. Molecular analysis of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 72, p. 727–734, 2010.
- JIANG, L. et al. Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu. **Chemosphere**. v. 82, n. 6, p. 822–828, 2011.
- KAYANSAMRUAJ, P. et al. Molecular characterization and virulence gene profiling of pathogenic *Streptococcus agalactiae* populations from tilapia (*Oreochromis* sp) farms in Thailand. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, n. 4, p. 488–495, 2014.
- KEARNEY, J. Food consumption trends and drivers. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1554, p. 2793–2807, 2010.
- KOLPIN, D.; FURLONG, E.; ZAUGG, S. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U. S. streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. **Environmental Science and Technology**. v. 36, p. 1999–2000, 2002.
- KOWALSKI, P.; KONIECZNA, L.; CHMIELEWSKA, A.; OLEDZKA, I.; PLENIS, A.; BIENIECKI, M.; LAMPARCZYK, H. Comparative evaluation between capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the analysis of florfenicol in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 39, p.

- 983- 989, 2005.
- KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**. v. 75, p. 417- 434, 2009.
- LAI, H.; HOU, J., SU, C.; CHEN, C. Effects of chloramphenicol , florfenicol , and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 329–334, 2009.
- LANGSTON, C.; GAUNT, P. S.; WRZESINSKI, C.; GAO, D.; ADAMS, D.; CROUCH, L.; SWEENEY, D.; ENDRIS, R. Single intravenous and oral dose pharmacokinetics of florfenicol in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of Veterinary and Pharmacology Therapy**. v. 35, p. 503- 507, 2011.
- LEUNG, T. L. F.; BATES, A. E. More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: Implications for food security. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, n. 1, p. 215–222, 2013.
- LEWBART, G. A.; PAPICH, M. G.; WHITT- SMITH, D. Pharmacokinetics of florfenicol in the red pacu (*Piaractus brachypomus*) after single dose intramuscular administration. **Journal of Veterinary and Pharmacology Therapy**. v. 28, p. 317- 319, 2005.
- LI, K. et al. Management measures to control diseases reported by tilapia (*Oreochromis spp.*) and whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmers in Guangdong, China. **Aquaculture**. v. 457, p. 91–99, 2016.
- LILLEHAUG, A.; LUNESTAD, B. T.; GRAVE, K. Epidemiology of bacterial diseases in Norwegian aquaculture-a description based on antibiotic prescription data for the ten-year period 1991 to 2000. **Disease of Aquatic Organisms**. v. 53, p. 115–125, 2003.
- LIM, J. et al. Plasma and tissue depletion of florfenicol in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration. **Aquaculture**. v. 307, n. 1–2, p. 71–74, 2010.
- LIU, W. et al. Plant physiology and biochemistry impacts of florfenicol on marine diatom *Skeletonema costatum* through photosynthesis inhibition and oxidative damages. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 60, p. 165–170, 2012.
- LIU, X.; CALEB, J.; MENG, X. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: A review. **Environmental Pollution**. v. 223, p. 161–169, 2017.
- LÓPEZ-SERNA, R. et al. Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction – liquid chromatography-electrospray – tandem mass spectrometry. **Talanta**. v. 83, p. 410–424, 2010.
- LU, H.H., JØRGENSEN, S.E., 1999. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish

- fish farming. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 36, p.1–6, 1999.
- MALDONADO, M. A. et al. Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. **PLoS ONE**. v. 7, n. 8, p. 26–28, 2012.
- MARTINEZ-PORCHAS, M.; MARTINEZ-CORDOVA, L. R. World aquaculture: environmental impacts and troubleshooting alternatives. **The scientific World Journal**. v. 2012, p. 1- 9, 2012.
- MARTINS, A.; GUIMARÃES, L.; GUILHERMINO, L. Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to *Daphnia magna* assessed at two temperatures. **Environmental Toxology and Pharmacology**. v.36, p. 1022–1032, 2013.
- MARTINSERP, B. et al. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater at 11 °C. **Aquaculture**. v. 112, p. 1-11, 1993.
- MIAN, G. F. et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1–2, p. 180–183, 2009.
- MICHAEL, C.; KEROUAULT, B.; MARTIN, C. Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. v. 95, p. 1008-1015, 2003.
- MIRANDA, C. D.; ROJAS, R. Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage. **Aquaculture**. v. 266, p. 39–46, 2007.
- MIRANDA, C. D.; TELLO, A.; KEEN, P. L. Mechanisms of antimicrobial resistance in finfish aquaculture environments. **Frontiers in Microbiology**. v. 4, p. 2001–2006, 2013.
- MO, W. Y. et al. Application of veterinary antibiotics in China’s aquaculture industry and their potential human health risks. **Environmental Science Pollution Research**. v. 24, p. 8978–8989, 2017.
- MOULY, S., C. LLORET-LINARES, P. O. SELLIER, D. SENE, AND J. F. BERGMANN. Is the clinical relevance of drug-food and drug-herb interactions limited to grapefruit juice and Saint-John’s Wort? **Pharmacological Research**, v. 118, p. 82–92, 2017.
- MPA (Ministério da Pesca e Aquicultura). Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Brasil 2010.
- MSANGI, S. et al.. Fish to 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture. World Bank Report 83177-GLB. Washington, DC: World Bank, 2013.
- MURILLO, M. et al. Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface

- waters. **Water Research**. v. 5, p. 6709-6717, 2011.
- NAYLOR, R. L.; GOLDBURG, R. J.; PRIMAVERA, J. H.; KAUTSKY, N.; BEVERIDGE, M. C. M.; CLAY, J.; FOLK, C.; LUCHENCO, J.; MOONEY, H.; TROELL, M. Effect of aquaculture on world fish supplies. **Nature**. v. 405, p. 1017- 1024, 2000.
- NG, W. K.; HANIM, R. Performance of genetically improved Nile tilapia compared with red hybrid tilapia fed diets containing two protein levels. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 9, p. 965–972, 2007.
- NG, W. K.; ROMANO, N. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, n. 4, p. 220–254, 2013.
- NIPH, 2017. Norwegian Institute of Public Health. Increased use of medicines in Norwegian fish farming. Disponível em <<https://www.fhi.no/en/hn/drug/fisk/increased-use-of-medicines-in-norwe/>>. Acessado em: janeiro 2018.
- 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.
- NRC, 2011 Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Washington, DC: National Academies Press.
- ONU (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS). Los pequeños estanques\_ grandes integradores de La producción agropecuaria y la cria de peces. Roma 2000.
- OPPEDAL, F.; DEMPSTER, T.; STIEN, L. H. Environmental drivers of Atlantic salmon behaviour in sea-cages: A review. **Aquaculture**, v. 311, n. 1–4, p. 1–18, 2011.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. Aquicultura no Brasil, o desafio é crescer. 276p. Edição: Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca, Brasília, 2008.
- OZAKTAS, T.; TASKIN, B.; GOZEN, A. G. High level multiple antibiotic resistance among fish surface associated bacterial populations in non-aquaculture fresh at environment. **Water research**. v. 46, p. 6382-6390, 2012.
- PAOLUCCI, M. et al. Development of Biopolymers as Binders for Feed for Farmed Aquatic Organisms. **Aquaculture**, p. 3–35, 2012.
- PARK, B.; LIM, J.; YUN, H. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in the Korean catfish (*Silurus asotus*). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 29, p. 37–40, 2006.
- POULIQUEN, H. et al. Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents

- (oxytetracycline oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water, freshwater and seawater under abiotic conditions. **Aquaculture**. v. 262, p. 23–28, 2007.
- PRUDENT, A. Balancing water sustainability and public health goals in the face of growing concerns about antibiotic resistance. **Environment Science Technology**. v.48, p. 5-14, 2014.
- RANJAN, A.; SAHU, N. P.; GUPTA, S. Prospects of Medicated Feed in Aquaculture. **Nutrition Food Science International Journal**, v. 3, p. 5-14, 2017.
- REDA, R. M.; IBRAHIM, R. E.; AHMED, E. N. G.; EL-BOUHY, Z. M. Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 39, p. 241–248, 2013.
- RICO, A.; PHU, T. M.; SATAPORNVANIT, K.; SHAHABUDDIN, A. M.; HENRIKSSON, P. J. G.; MURRAY, F. J.; DALSGAARD, A.; BRINK, P. J. V. Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. **Aquaculture**. v. 412-413, p. 231-243, 2013.
- RICO, A.; SATAPORNVANIT, K.; HAQUE, M. M.; MIN, M.; NGUYEN, T. N.; TELFER, T. C.; BRINK, P. J. V. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risk: a critical review. **Aquaculture**. v. 4, p.735-93, 2012.
- RIGOS, G.; ALEXIS, M.; NENGAS, I. Leaching, palatability and digestibility of oxytetracycline and oxolinic acid included in diets fed to sea bass *Dicentrarchus labrax* L. **Aquaculture Research**. v.30, p. 841-847, 1999.
- SACHER, F.; THOMAS, F. Pharmaceuticals in groundwaters analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wuerttemberg, Germany. **J of Chromatogr A**. v. 938, p. 199–210, 2001.
- SAMUELSEN, O. B.; BERGH, Ø.; ERVIK, A. Pharmacokinetics of florfenicol in cod *Gadus morhua* and in vitro antibacterial activity against *Vibrio anguillarum*. **Dis Aquat Org** v. 56, p. 127–133, 2003.
- SANTOS, L. H. M. L. M. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**. v. 175, p. 45–95, 2010.
- SAPKOTA, A.; SAPKOTA, A. R.; MUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER, P.; LAWRENCE, R. Aquaculture practices and potential human health risk: current knowledge and future priorities. **Environment International**. v. 34, p. 1215-



- 1226, 2008.
- SCHERING- PLOUGH ANIMAL HEALTH AQUACULTURE, Technical bulletin Aquaflor. Disponível em: < [http://aqua.merck-animal-health.com/binaries/PDF\\_200610\\_tech\\_bulletin\\_tcm56-34712.pdf](http://aqua.merck-animal-health.com/binaries/PDF_200610_tech_bulletin_tcm56-34712.pdf) > Acesso em abril de 2018.
- SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 28, p. 519- 542, 2004.
- SENHORINI, A.; FORESTI, F. Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. **Reviews in Aquaculture**. v.4, p. 108–118, 2012.
- SERNAPESCA, 2017. Servicio Nacional de Pesca y acuicultura. Gobierno del Chile Fiscalización en pesca y acuicultura\_ Informe de actividades del año 2016. Disponível em: <[http://www.sernapesca.cl/presentaciones/DN/SERNAPESCA\\_IFPA\\_2016.pdf](http://www.sernapesca.cl/presentaciones/DN/SERNAPESCA_IFPA_2016.pdf)>. Acesso em abril de 2018.
- SERRANO, P.H. Responsible use of antibiotics in aquaculture. Fisheries Technical Paper 469, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, 2005.
- SHAO, Z. J. Aquaculture pharmaceuticals and biological: current perspectives and future possibilities. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 50, p. 229-243, 2001.
- SINDAN, 2017. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal \_ Compêndio de Produtos veterinários. Disponível em: < <http://www.cpv.com.br/cpv/>>. Acesso em abril de 2018.
- SOMGA, S. S., SAMGA, J. R. AND REGIDOR, S. E., 2012. O Use of veterinary medicines in Philippine aquaculture: current status. In: M.G. Bondad-Reantaso, J.R. Arthur & R.P. Subasinghe, eds. Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production, p. 69-82. FAO Fisheries Technical Paper N° 547. Rome, FAO. 207 pp.
- SOTO, E.; ENDRIS, R. G.; HAWKE, J. P. *In vitro* and *in vivo* efficacy of florfenicol for treatment of *Francisella asiatica* infection in Tilapia. **Antimicrob Agents Chemotherapy**. v. 54, p. 4664-4670, 2010.
- STOLL, C.; SIDHU, J. P. S.; TIEHM, A.; TOZE, S. Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water sample collected from Germany and Australia. **Environment Science Technology**. v.46, p. 9716-9726, 2012.
- SUN, Y. et al. Fate of florfenicol in a simulated aquatic ecosystem and effects on sediment microflora. **Water Environmental Research**. v. 84, p. 1–6, 2010.

- THI, P. et al. Science of the Total Environment Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. **Science of the Total Environment**. v. 409, n. 15, p. 2894–2901, 2011.
- TRONG, T. Q. et al. Heritability and genotype by environment interaction estimates for harvest weight, Growth rate, And shape of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) grown in river cage and VAC in Vietnam. **Aquaculture**, v. 384–387, p. 119–127, 2013.
- TUŠEVLJAK, N.; RAJIĆ, A.; UHLAND, L.; REID-SMITH, R.; MCEWEN, S. Antimicrobial use and resistance in selected zoonotic bacteria in aquaculture: preliminary findings of a survey of aquaculture- allied professionals. Retirado de FAO (Food and Agriculture Organization) Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. p. 45-50, 2012.
- VALLADÃO, G., GALLANI, S., PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Rev. Aquac.** p.1–19, 2016.
- VAZQUEZ-ROIG, P. et al. Science of the Total Environment Risk assessment on the presence of pharmaceuticals in sediments , soils and waters of the Pego – Oliva Marshlands (Valencia , eastern Spain). **Science of the Total Environmental**. v. 440, p. 24–32, 2012.
- WALTER, R. H.; TALOMIE, T. G. Quantitative definition of polysaccharide hydrophilicity. **Food Hydrocolloids**, v. 4, n. 3, p. 197–203, 1990.
- WANG, S.; CHEN, N.; QU, Y. Solubility of florfenicol in different solvents at temperatures from (278 to 318) K. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 56, n. 3, p. 638–641, 2011.
- WELCH, T. J. et al. IncA/C plasmid-mediated florfenicol resistance in the catfish pathogen *Edwardsiella ictaluri*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 845–846, 2009.
- WHO, Antimicrobial resistance: global report on surveillance. In World Health Organization, 2014. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf). Acesso em abril de 2018.
- WONGTAVATCHAI, J., MCLEAN, L.G., RAMOS, F., ARNOLD, D., 2004. WHO Food Additives series 53: Chloramphenicol. JECFA (WHO: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), IPCS (International Programme on Chemical Safety)

INCHEM, pp 7–85. Accessed April 2018:

<<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v23je02.htm>>.

- XINHUA, Y.; WEN, C. Use of veterinary medicines in Chinese aquaculture: current status. Retirado de FAO (Food and Agriculture Organization). Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. p. 51-67, 2012.
- XU, D.; ROGERS, W. A. Leaching Loss from Oxytetracycline Medicated Feeds. **Journal of Applied Aquaculture**. v. 4, n. 1, p. 29–38, 1994.
- XUAN, T.; MUNEKAGE, Y. Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam. **Marine Pollution Bulletin**. v. 49, p. 922–929, 2004.
- YAMASHITA, N., YASOJIMA, M., NAKADA, N., MIYAJIMA, K., KOMORI, K., SUZUKI, Y., 2006. Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms. **Water Science and Technology**. v. 53, p.65-72, 2006.
- YAN, C. et al. Antibiotics in the surface water of the Yangtze Estuary: Occurrence, distribution and risk assessment. **Environmental Pollution**, v. 175, p. 22–29, 2013.
- YANG, Q.; XIE, L.; WU, Z.; CHEN, X.; YANG, Y.; LIU, J.; ZHANG, Q. Pharmacokinetics of florfenicol after oral dose administration in Yellow Catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. **Journal of the world aquaculture society**. v. 44, p. 586- 592, 2013.
- YAO, L. et al. Science of the Total Environment Seasonal variation of antibiotics concentration in the aquatic environment: a case study at Jiangnan Plain, central China. **Science of the Total Environment**. v. 527–528, p. 56–64, 2015.
- YUAN, Y. et al. Economic profitability of tilapia farming in China. **Aquaculture International**, v. 25, n. 3, p. 1253–1264, 2017.
- 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.
- ZHANG, Q. et al. Occurrences of Three Classes of Antibiotics in a Natural River Basin: Association with Antibiotic-Resistant Escherichia coli. **Environmental Science and Technology**. v. 48, p. 14317-14325, 2014.
- ZHAO, L.; DONG, Y. H.; WANG, H. Science of the Total Environment Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China.

**Science of the Total Environment**, v. 408, n. 5, p. 1069–1075, 2010.

ZOCCARATO, I., GASCO, L., CALVI, S. L., FORTINA, R., BIANCHINI, M., & ROLLIN, X. Effect of dietary avoparcin on performances and carcass composition in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, 26, 361–366, 1995.

ZONG, H.; MA, D.; WANG, J. Research on Florfenicol Residue in Coastal Area of Dalian (Northern China) and Analysis of Functional Diversity of the Microbial Community in Marine Sediment. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**. v.84, p. 245–249, 2010.

ANEXO

## PARECER DO COMITE DE ÉTICA




---

 Meio Ambiente

## AUTORIZAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES DE ENSINO OU DE PESQUISA CIENTÍFICA

Certificamos que a proposta intitulada "Aplicação de diferentes veículos para recobrimento de rações para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) medicadas com florfenicol e seus impactos na liberação do fármaco para água, digestibilidade e palatabilidade", registrada com o nº 002/2017, sob a responsabilidade de Hamilton Hisano que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.399, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente, em reunião de 12/04/2017.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica
Vigência da autorização	03/2017 a 12/2017
Espécie/linhagem/raça	<i>Oreochromis niloticus</i> e <i>Piaractus mesopotamicus</i>
Nº de animais	120 de cada espécie
Peso/idade	100 g
Sexo	macho
Origem	Piscicultura da região de Mogi Mirim - SP

Jaguariúna, 13/04/2017

  
 Coordenadora da CEUA

  
 Secretário da CEUA