

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

**RESIDUALIDADE DA OXITETRACICLINA NO TECIDO DO
CAMARÃO MARINHO *LITOPENAEUS VANNAMEI* (BOONE, 1931)
(CRUSTACEA, DECAPODA) SUBMETIDO A TRATAMENTO
ANTIBIÓTICO**

ANTÔNIO CARLOS NOGUEIRA DE LIMA

**Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciências Marinhas Tropicais do Instituto
de Ciências do Mar da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial
à obtenção do título de MESTRE.**

Orientador
Alberto Jorge Pinto Nunes

Coorientadora
Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira

**FORTALEZA – CE
Abril / 2004**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

**RESIDUALIDADE DA OXITETRACICLINA NO TECIDO DO
CAMARÃO MARINHO *LITOPENAEUS VANNAMEI* (BOONE, 1931)
(CRUSTACEA, DECAPODA) SUBMETIDO A TRATAMENTO
ANTIBIÓTICO**

ANTÔNIO CARLOS NOGUEIRA DE LIMA

FORTALEZA – CE

Abril / 2004

Após a finalização dos trabalhos de Apresentação da Dissertação de Mestrado de ANTÔNIO CARLOS NOGUEIRA DE LIMA, intitulado “Residualidade da Oxitetraciclina no Tecido do Camarão Marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Crustacea, Decapoda) Submetido a Tratamento Antibiótico”, a Banca Examinadora, concebendo o conteúdo do trabalho e a apresentação realizada, considera a Tese aprovada.

Alberto Jorge Pinto Nunes, PhD (Orientador): _____

Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira, PhD (Coorientadora): _____

Jair Mafezoli, Dr.: _____

Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, Dra.: _____

Fortaleza, 30 de abril de 2004.

A Força do Comprometimento

Enquanto não estivermos compromissados, haverá hesitação, a possibilidade de recusar, e sempre a ineficácia. Em relação a todos os atos de iniciativa e de criação existe uma verdade elementar, cuja ignorância mata inúmeros planos e idéias esplêndidas: que no momento em que, definitivamente, nos compromissamos, a providência divina também se põe em movimento... Todos os tipos de coisas ocorrem para nos ajudar, que em outras circunstâncias nunca teriam ocorrido.

Todo um fluir de acontecimentos surge a nosso favor como resultado da decisão, todas as formas imprevistas de coincidências, encontros e ajuda material, que nenhum homem jamais poderia ter sonhado encontrar em seu caminho... Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar, você pode começar. A coragem contém em si mesma, a força e a magia.

GOETHE

*À minha esposa Márcia,
aos nossos filhos Arthur Luis e Ana Lethicia
que tanto amamos.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais e irmãos, pela união e ensinamentos nos momentos de desafios.

À Professora Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira e ao Professor Alberto Jorge Pinto Nunes, pelo acompanhamento, orientação e experiências repassadas.

Aos Professores Jair Mafezoli e Conceição F. de Oliveira, pela participação e amizade construída.

Ao Alex, à Cândida, ao Daniel Lustosa, à Graça, ao João, ao Pedro Carlos; em especial à Kilvia Craveiro, ao Pedro Alexandre e ao Glaydson, por suas cooperações valiosas. A todos os componentes do Grupo de Estudos de Camarões Marinhos do Instituto de Ciências do Mar, pelo auxílio significativo na execução do Projeto, mas essencialmente pela manifestação de suas amizades.

Ao Professor Antônio Adauto Fonteles Filho, pela enorme contribuição na análise estatística.

Aos (Às) estagiários (as) Alice, Andrezza, Martoni e Milena, pelo comprometimento e seriedade revelados.

Aos administradores e funcionários da Empresa Aquacel, pela receptividade e disponibilidade da unidade de cultivo.

Aos funcionários e servidores do Instituto de Ciências do Mar-LABOMAR que colaboraram para a execução do Projeto.

À FUNCAP, pelo financiamento deste Projeto e pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

TABELAS

FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1.	Residualidade nos Ecossistemas e Resistência Bacteriana	8
2.2.	Tratamento e Residualidade em Organismos Cultivados e Espécies Silvestres	10
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1.	Desenho Experimental	17
3.1.1.	Local dos Estudos	17
3.1.2.	Modos Operacionais	17
3.2.	Regime de Tratamento	19
3.3.	Frequência e Técnica de Amostragem	20
3.4.	Análise das Amostras	21
3.4.1.	Reagentes e Soluções	21
3.4.2.	Preparação das Amostras e Técnica de Extração	21
3.4.3.	Condições Analíticas	22
3.4.4.	Validação Estatística	22
3.4.4.1.	Recuperação	22
3.4.4.2.	Curva de Calibração	23
4.	RESULTADOS	26
4.1.	Análises	27
4.2.	Parâmetros Físico-químicos	28
4.3.	Residualidade	29

4.3.1.	Tratamento sob Condições de Laboratório	29
4.3.2.	Tratamento sob Condições Naturais	32
5.	DISCUSSÃO	36
6.	CONCLUSÕES	44
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

TABELAS

Tabela I	Níveis de garantia da ração Camaronina-35 (Agribands Purina do Brasil Ltda), administrada no tratamento antibiótico.	20
Tabela II	Parâmetros zootécnicos dos estudos realizados em laboratório e em campo com o camarão <i>L. vannamei</i> , registrados durante um período de tratamento de 14 dias.	26
Tabela III	Parâmetros físico-químicos da água, monitorados durante a investigação em laboratório e sob condições seminaturais em viveiro de cultivo.	29

FIGURAS

Figura 1	Sistema de tanques empregados no tratamento antibiótico dos camarões estocados em laboratório.	18
Figura 2	Gaiolas empregadas no tratamento antibiótico dos camarões investigados em viveiro.	18
Figura 3	Curva de calibração das soluções-padrão injetadas no equipamento de cromatografia líquida (volume injetado 100uL).	24
Figura 4	Cromatograma típico mostrando os picos da OTC (volume injetado 100µL; tempo de retenção 4,5 minutos): (a) injeções das soluções-padrão empregadas na construção da curva de calibração; (b) injeção de solução de extração de tecido muscular de <i>L. vannamei</i> .	27

- Figura 5** Concentração do antibiótico oxitetraciclina detectada no tecido abdominal de *L. vannamei*, durante e após tratamento com o fármaco na dosagem de 4g.kg^{-1} de ração, durante 14 dias, empregando ração medicada em camarões estocados em tanques. 31
- Figura 6** Concentração média do antibiótico oxitetraciclina detectada no tecido abdominal de *L. vannamei*, durante e após tratamento com o fármaco na dosagem de 4g.kg^{-1} de ração, durante 14 dias, empregando ração medicada em camarões estocados em tanques. 31
- Figura 7** Consumo acumulado diário de oxitetraciclina por camarões *L. vannamei*, estocados sob condições de laboratório e viveiro, recebendo dosagem de 4g OTC.kg^{-1} ração, durante um período de 14 dias. 33
- Figura 8** Concentração do antibiótico oxitetraciclina no tecido abdominal de *L. vannamei*, durante e após tratamento com o fármaco na dosagem de 4g.kg^{-1} de ração, durante 14 dias, empregando ração medicada em camarões estocados sob condições de viveiro. 34
- Figura 9** Concentração média da oxitetraciclina no tecido abdominal de *L. vannamei*, durante e após tratamento com o fármaco na dosagem de 4g.kg^{-1} de ração, durante 14 dias, empregando ração medicada em camarões estocados sob condições de viveiro. 34
- Figura 10** Velocidade de eliminação da oxitetraciclina no período de pós-tratamento, em termos percentuais, por camarões *L. vannamei* medicados nos ambientes experimentais de campo e laboratório. 35

RESUMO

O cultivo de camarões é uma importante atividade econômica e tornou-se a indústria que mais cresce no Nordeste brasileiro atualmente. Problemas com enfermidades são comuns na aquicultura e pelo menos sete espécies de bactérias do gênero *Vibrio* têm sido registradas infectando camarões durante diferentes estágios de cultivo. A oxitetraciclina (OTC) tem sido utilizada mundialmente contra esses patógenos. Na presente pesquisa, a distribuição e depleção de resíduos de OTC no tecido de *Litopenaeus vannamei* foram avaliadas depois de 7 dias de exposição à ração medicada contendo 4g.kg^{-1} . Foram conduzidos dois experimentos: em tanques sob condições controladas em laboratório e em gaiolas instaladas em um viveiro de uma unidade de cultivo. Os animais medicados foram amostrados periodicamente, durante o tratamento e pós-tratamento. Os níveis de OTC foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE. Embora em ambos os ambientes experimentais o tratamento tenha sido semelhante, os picos de OTC foram diferentes. Depois de 7 e 12 dias de exposição, as concentrações no tecido dos camarões foram $17,21\ \mu\text{g.g}^{-1}$ e $3,78\ \mu\text{g.g}^{-1}$ nos estudos realizados em laboratório e campo, respectivamente. A concentração média observada nos ambientes em estudo manteve-se dentro dos limites da concentração inibitória mínima-CIM, referida para o tratamento de vibrioses. Durante as primeiras 72 horas após cessado o tratamento, resíduos da droga reduziram muito rapidamente, sendo eliminados mais lentamente depois deste período. O nível residual de segurança de $0,10\ \mu\text{g.g}^{-1}$, imposta pela Comunidade Européia, foi alcançado no 16º. dia de pós-tratamento. Depois do 25º. dia nenhum resíduo da droga pôde ser detectado. Entretanto, devido à influência de fatores ambientes neste processo, recomenda-se um período de eliminação mais longo como medida de segurança para obtenção da eliminação completa da droga.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, oxitetraciclina, antibiótico, residualidade.

ABSTRACT

Shrimp culture is a very important economic activity in the world and the fastest growing industry in Northeast Brazil. Problem with diseases are common in aquaculture and at the least seven species of *Vibrio* bacteria have been registered infecting shrimps during different culture stages. Oxytetracycline (OTC) has been widely used against these pathogens. In this research the distribution and residue depletion of OTC in *Litopenaeus vannamei* tissue were evaluated after 14 days of exposure to medicated feed containing 4g.kg⁻¹. Two trials were conducted: in indoor tanks under laboratory controlled conditions and in outdoor enclosures installed in a commercial shrimp grow-out pond. Medicated animals were sampled periodically, during treatment period and thereafter. The tissue levels of OTC were measured by high performance liquid chromatograph-HPLC. Although in both treatments shrimp were similar conditions, OTC peak concentrations were different. After 7 and 12 days off exposure to OTC, residual values in shrimp tissues were 17,21 µg.g⁻¹ and 3,78 µg.g⁻¹ for the laboratory and field studies, respectively. Mean OTC residual tissue concentration observed both in the laboratory and field trial are within the limits of minimum inhibitory concentration (MIC) referred to vibriosis treatment. During the first 72 hours after the treatment ceased drug residues dropped fast, slowing down afterwards. A safe residue level of 0,1µg.g⁻¹ following the European Community requirements, were attained at day sixteen of OTC withdrawal. After 25 days of OTC withdrawal no drug residues could be detected. However, it is recommended a longer withdrawal period as a safeguard to obtain complete drug depletion.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, oxytetracycline, antibiotic, residues

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de organismos aquáticos em 2001, proveniente da pesca e da aquicultura, girou em torno de 142,1 milhões de toneladas; deste volume, a aquicultura contribuiu com valores acima de 48,4 milhões de toneladas, equivalentes a US\$ 61,4 bilhões em receitas geradas (FAO, 2003). Entre 1990 e 2001 este órgão aponta ainda, os setores da aquicultura que mais apresentaram incremento relativo: moluscos (212,1%), seguido dos peixes (181,8%), plantas aquáticas (181,5%) e crustáceos (161,7%) e o aumento significativo na produção de anfíbios e répteis que atingiram nesse período, acréscimos de 10.394,3% na produção. O grupo dos crustáceos gerou 1,9 milhões de toneladas em 2001, o equivalente a 11,5 bilhões em receitas, onde os camarões marinhos responderam por um total de 64,0 %, ou seja, 1,2 milhões de toneladas de produção.

Segundo Rosenberry (2003), a produção de camarões cultivados em 2002 girou em torno de 1,6 milhões de toneladas, apresentando incremento relativo de 33,3%. As projeções para a indústria nos próximos anos são de crescimento na razão de 10-20% ao ano.

Nos últimos anos, a aquicultura no Brasil apresentou crescimento superior à média mundial. De 20,5 milhões de toneladas em 1990 a 210 milhões de toneladas em 2001, houve um salto de 925% na produção nacional, enquanto o incremento global registrado foi de 187%, no mesmo período (Boscardin-Borghetti *et al.*, 2003).

Entre 1978 e 1984, surgiram os primeiros estímulos à produção comercial de camarão confinado, adotando a espécie exótica *Marsupenaeus japonicus* (Bate, 1888), no Estado do Rio Grande do Norte. Ao final deste período, invernos intensos reduziram drasticamente a produtividade, quando a espécie foi exposta a condições climáticas desfavoráveis ao seu desenvolvimento. Despontaram então, investimentos visando a domesticação de camarões da costa brasileira. A espécie nativa *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez Farfante, 1967) passou a ser a mais cultivada, essencialmente em sistemas extensivos. O limitado conhecimento sobre as exigências nutricionais dessa espécie e a deficiência de rações adequadas, contudo, promoveram reduzidas taxas de crescimento e, conseqüentemente, uma baixa produtividade (400 a 600 kg/ha/ano) (ABCC, 2003).

Em meados da década de 90, teve início o cultivo comercial da espécie exótica *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), natural da Costa do Pacífico, passando desde então a dominar os estoques brasileiros. Esta espécie se adaptou perfeitamente às condições geoclimáticas brasileiras. Associadas a este aspecto, as técnicas de maturação, larvicultura e

engorda foram aperfeiçoadas; qualificou-se a mão de obra e rações adequadas às exigências nutricionais do *L. vannamei* passaram a ser disponibilizadas no mercado nacional. Como resultado, este camarão passou a ser a única espécie cultivada comercialmente no Brasil (Plataforma Tecnológica do Camarão Marinho, 2001).

A combinação desses fatores incentivou o crescimento da carcinicultura nas unidades de cultivo no Brasil, que exportou um volume total de 34,2 mil toneladas em 2002 e 54,0 mil toneladas em 2003, posicionando-se atualmente entre os sete maiores produtores mundiais (ABCC, 2003).

Incrementos anuais na produção global de camarões marinhos resultaram de incentivos às pesquisas, impulsionados essencialmente pelos setores público e privado, permitindo maior conhecimento da biologia das espécies cultivadas e aprimoramentos gradativos dos sistemas e das técnicas de produção. O desenvolvimento da atividade, porém, tem refletido de forma adversa nos ambientes de cultivo, bem como nos ecossistemas naturais (GESAMP, 1997; Tendência & De La Peña, 2001), sendo motivo de restrição ao seu crescimento em vários países, inclusive no Brasil. Contudo, observa-se um nítido avanço nas técnicas de cultivo e uma crescente assimilação e adoção de normas de produção as quais envolvem conceitos de responsabilidade social e ambiental.

Ademais, a carcinicultura enfrenta novos desafios, dentre os quais o combate às enfermidades. Doenças virais, associadas a uma série de questões ambientais promoveram um acentuado declínio na produção mundial desses crustáceos entre 1990-1996 (Boscardin-Borghetti *et al.*, 2003). O estresse comumente torna-se o vetor responsável pelo surgimento ou manifestação dessas enfermidades em camarões peneídeos, que são geralmente ocasionadas ou associadas às bactérias oportunistas do gênero *Vibrio* (Malvise *et al.*, 1996; CEFAS, 1997; Mohny *et al.*, 1997; Gräslund *et al.*, 2002; Reed *et al.*, 2004). Segundo Alderman (1994), têm sido registrados mais de 100 patógenos de origem bacteriana em organismos aquáticos.

Produtos químicos de distintas composições, entre os quais os antibióticos, até então somente utilizados na veterinária e saúde humana, passaram também a ser aplicados no combate às enfermidades adquiridas por organismos aquáticos cultivados comercialmente. A administração de químicos como ferramenta de manejo da água e sedimentos, bem como no tratamento das espécies em cultivo, passou a ser adotada de forma um tanto generalizada e desordenada, por insuficiência de regulamentações específicas e controle governamental. Legislações regionais, associadas às condições adversas dos viveiros, têm motivado a

administração de diversos bactericidas. Conforme a especificidade, alguns químicos são aplicados antes do povoamento dos ambientes aquáticos por organismos cultiváveis como forma de controle; outros, entretanto, tais como algicidas e ou bactericidas, são aplicados comumente durante o processo de produção, acentuando o risco de afetar os organismos cultivados (Cornejo, 2002).

Dentre as diversas espécies de antibióticos, a oxitetraciclina-OTC provavelmente seja o composto mais empregado no tratamento de enfermidades na aquicultura. Esta droga age ao nível do ribossomo, inibindo a síntese protéica bacteriana. Ocorre, todavia, interferência na absorção pelos organismos quando o veículo de consumo contém alumínio, cálcio ou magnésio e em preparações contendo ferro (MERCK, 2000); comercializada nas formas anfotérica e cloridrato, ambas as estruturas rapidamente inativam-se por hidróxidos alcalinos e por soluções ácidas abaixo do pH 2. Custo reduzido, aplicabilidade oral ou em banho e amplo espectro de ação e alta potência, atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (Pouliquen *et al.*, 1996; GESAMP, 1997) e a baixa toxicidade (Moretti *et al.*, 1994) justificam sua aceitabilidade. Reed *et al.* (2004) referem-se à eficácia da oxitetraciclina em infecções bacterianas em peixes e no tratamento de vibrioses e hepatopancreatite necrosante (NHP) em camarões cultivados. As bactérias *Vibrio harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* e *V. alginolyticus*, e com menor frequência *V. damsela* e *V. fluvialis* são as principais responsáveis pelas vibrioses. *Rickettsia*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium marinum* também podem afetar estes organismos.

As tetraciclinas também são usadas em aplicações não-terapêuticas como: ativadores de crescimento, conservação de alimentos e controle microbiológico (Korolkovas *et al.*, 1988).

Informações insuficientes a respeito dos impactos dessas substâncias no tratamento animal suscitam outros questionamentos. Os reais efeitos na fisiologia dos animais medicados, sua residualidade, as possíveis interações e suas intensidades nos ambientes de cultivo em regiões tropicais e temperadas; que conseqüências diretas ou indiretas podem advir à saúde humana são pontos que merecem ser estudados. Conseqüentemente, acentuaram-se as investigações no meio científico e o aperfeiçoamento de práticas de manejo no setor produtivo, devido à crescente preocupação mundial em preservar a qualidade dos alimentos aquícolas destinados ao consumo humano. Tem sido bastante discutido o desenvolvimento de resistência por bactérias, quando submetidas

inadequadamente a estes fármacos; por sua vez, investigações associam a transferência dessa resistência a animais em ambiente natural e ao homem.

A intensificação dos sistemas de produção deve englobar ações que promovam redução dos riscos gerados pelo uso de substâncias químicas na aquicultura. Sabe-se que o emprego de alguns químicos torna-se necessário; em alguns casos, portanto, mecanismos precisam ser adotados para o registro e controle desses produtos, visando à proteção dos ambientes naturais e da saúde humana e, conseqüentemente, garantir um crescimento sustentável da atividade (GESAMP, 1997).

A avaliação de riscos associados ao uso de quimioterápicos torna-se difícil devido à escassez de dados quantitativos em países que praticam a aquicultura, uma vez que, as informações disponíveis sobre sua eficácia, metabolização, tempo de residência no tecido dos organismos cultivados e ação sobre o meio ambiente têm origem de regiões de climas temperados. Tais informações, porém, podem não se confirmar em climas tropicais, onde temperatura, tipo de solo, água e espécies cultivadas apresentam diferentes características.

Dentre as técnicas analíticas existentes aplicáveis na detecção de tetraciclina-TCs a cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE (ou HPLC em inglês) tem produzido os melhores resultados, proporcionando leitura em níveis ínfimos de concentração (Bermúdez-Almada *et al.*, 1999). A CLAE consiste numa técnica sofisticada de separação química e análise quantitativa de uma extensa série de compostos químicos presentes em variados tipos de amostras, em escala de minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade, podendo ser totalmente automatizada. Procedimentos químicos complexos e variados permitem a separação e purificação das tetraciclina dos íons metais e proteínas existentes naturalmente nas amostras às quais se ligam facilmente (Oka *et al.*, 2000; Montoya & Uyaguari, 2003; Carson *et al.*, 2002). A técnica permite até mesmo a detecção de compostos (TCs) biologicamente indisponíveis (GESAMP, 1997), ou seja, não detectável pelos métodos biológicos.

Devido à inexistência de pesquisas em condições regionais, o presente estudo vem contribuir para o levantamento de dados importantes para a aquicultura, avaliando a residualidade da oxitetraciclina em animais testados em laboratório, bem como a provável interferência dos fatores ambientais nesse processo. Esta pesquisa buscou investigar a residualidade do antibiótico oxitetraciclina em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, como também estimar o tempo de residência do composto em animais medicados, mantidos em um sistema com recirculação de água, sob condições controladas de laboratório.

Considerando a interferência dos fatores ambientais no processo de absorção, acumulação e liberação do composto do tecido animal, assim como na lixiviação do fármaco do veículo de tratamento (ração), experimento semelhante foi desenvolvido com animais estocados em gaiolas instaladas em um viveiro de cultivo. A técnica da CLAE foi empregada na detecção e quantificação da oxitetraciclina no tecido muscular dos camarões utilizados na investigação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os diversos efeitos gerados pelo uso do antibiótico oxitetraciclina, e de outras drogas aplicadas na aquicultura, no tratamento de peixes, moluscos e crustáceos, controle e manejo do solo e da água nos ambientes de cultivo e impactos nos ecossistemas, têm sido temas de grande interesse e estudo.

Resistência bacteriana, residualidade e cinética dos fármacos em diferentes tecidos de animais tratados, e ainda seus efeitos na saúde humana quando aplicados inapropriadamente têm sido a principal matéria em discussão. Com poucas exceções, os antibióticos aplicados atualmente na aquicultura não foram desenvolvidos especificamente para este fim, portanto, dados para avaliar os riscos produzidos nos ecossistemas aquáticos, em especial marinhos e costeiros, são inexistentes, ou na maioria das vezes inconsistentes. O Continente Asiático, em especial a região Sudeste, responsável por elevada produção de camarões cultivados, tem sido relatado freqüentemente como usuário de antibióticos na aquicultura, sobretudo a oxitetraciclina.

A Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO compõe um grupo de especialistas em proteção de ambientes marinhos denominado Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection-GESAMP que estabeleceu diretrizes seguras e eficazes ao uso de drogas na aquicultura de zonas costeiras. O Grupo avalia que a aplicação da maioria dos químicos nesta forma de cultivo, caso empregada com propriedade, pode ser considerada totalmente benéfica sem qualquer conseqüência adversa ao ambiente ou incremento de riscos à saúde dos aquicultores. Entretanto, semelhante aos demais setores usuários de recursos naturais, é imprescindível que a atividade seja administrada obedecendo a um conjunto de normas, critérios e instrumentos legais que, ao serem aplicados em níveis global e regional, poderão promover o desenvolvimento responsável e sustentável. Desde que inofensivos à saúde humana e aos ecossistemas, conhecimentos básicos sobre o uso de antibióticos devem ser empregados em qualquer região, independentemente das condições edafoclimáticas, mas sem esquecer os instrumentos reguladores e fiscalizadores.

Os Estados Unidos e Europa são os principais mercados importadores de camarões. O “Food and Drug Administration of the United States - FDA” e a “European Agency for the Evaluation of Medicinal Products - EMEA” produziram uma lista de drogas veterinárias

cuja aplicação é proibida nos territórios americano e europeu. Ambos os mercados detêm legislações próprias, porém semelhantes, que norteiam outros países produtores dependentes desses mercados, para comercialização dos seus produtos, estimulando-os a cumprir limites máximos de residualidade - LMR às drogas, cuja aplicação é tolerável em situações predefinidas. Drogas cuja toxicidade é elevada, pondo em risco a saúde humana - cloranfenicóis e nitrofuranos por exemplo - vários mercados legalmente têm determinado o chamado “tolerância zero”, ou seja, administração proibida sob quaisquer circunstâncias.

Somente três antibióticos são aprovados para aplicação na aquicultura pelo FDA nos Estados Unidos: oxitetraciclina-HCL no tratamento de salmonídeos, bagres e lagosta; sulfamerazin no tratamento de trutas, e Romet[®] 30, uma combinação de sulfadimetozin-ormetoprim no controle de furunculoses e septicemia entérica em salmonídeos e bagres (FDA, 1998). Estima-se o uso anual entre 57-114 mil toneladas de antibióticos no tratamento de septicemia entérica em bagres, espécie responsável por 2/3 da produção aquícola norte americana (Benbrook, 2002).

No Brasil, escassos instrumentos legais referem-se à administração de antibióticos. A Portaria Ministerial No. 193, de 12 de maio de 1998, proíbe o uso de clorotetraciclina, oxitetraciclina, penicilinas e sulfonamidas sistêmicas na alimentação animal. Todavia, avilamicina, bacitracina de zinco, sulfato de tilosina e virginiamicina são permitidos como promotores de crescimento (EMBRAPA, 2004).

Até então, somente empregados na prevenção e tratamento de enfermidades em organismos aquáticos de valor comercial, inclusive peixes ornamentais de água doce e marinhos, certos antibióticos, por razões distintas, passaram a ser aplicados por produtores com os seguintes propósitos: (a) promover a reprodução e o crescimento, (b) controlar parasitas e (c) ação tranqüilizante (FDA, 1998).

Gräslund *et al.* (2002) realizaram um levantamento dos produtos químicos e biológicos utilizados em fazendas de camarão em regiões costeiras e estuarinas na Tailândia. Dentre as três regiões estudadas, cada fazenda aplicava em média 13 produtos, destinados principalmente ao tratamento do solo e da água. A investigação registrou mais de 290 substâncias aplicadas. Destas, vários dos pesticidas, desinfetantes e antibióticos utilizados podiam gerar efeitos negativos nos animais cultivados, causar riscos ao consumo do alimento, doença ocupacional e ou efeitos negativos nos ecossistemas adjacentes. Grande parte das fazendas (74%) aplicava um ou vários tipos das 13 diferentes espécies de

antibióticos documentadas, sendo os grupos mais comuns as fluoroquinolonas, seguidas das tetraciclina e sulfonamidas destinados à prevenção e tratamento de infecções por vibrios. Na crença de que podiam prevenir e tratar infecções virais tal como a doença da mancha branca, “WSSV - White Spot Syndrome Virus” na Tailândia, os antibióticos eram geralmente adicionados à ração e oferecidos aos camarões várias vezes ao dia, por uma semana.

Nos Estados Unidos, cultivadores de salmão em gaiolas usam oxitetraciclina, e numa menor extensão, Romet[®] 30 e amoxicilina para prevenir ou tratar doenças de origem bacteriana (Capone *et al.*, 1996). No Equador, a oxitetraciclina é um dos antibióticos mais empregados pela indústria camaroneira (Montoya & Reyes, 2002). Porém, estudos de sensibilidade bacteriana desenvolvidos naquele país, demonstraram ocorrer menor resistência bacteriana e curta residualidade no tecido de animais medicados com Sarafin[®], agente ativo sarafloxacin, quando comparado a outros compostos comumente administrados no tratamento animal. Nitidamente, a aplicação de certos antibióticos no Sudeste Asiático põe em risco a saúde humana (Gräslund & Bengtsson, 2001). Situações semelhantes devem ocorrer em regiões produtoras de peixes na Europa, notadamente no oeste europeu, bem como nos demais países produtores de organismos aquáticos difundidos pelas Américas.

Dos grupos antibióticos existentes, a oxitetraciclina provavelmente é a mais aplicada na aquicultura, pois demonstra ser eficiente contra bactérias gram-positivas e gram-negativas tais como *Aeromonas* e *Vibrio* spp em peixes e crustáceos (Corliss, 1979). Infelizmente, tem-se registrado acentuado crescimento de resistência bacteriana, resultando, em alguns casos, em tratamentos ineficientes (Capone *et al.*, 1996; Smith, 1996). No setor aquícola, o emprego de oxitetraciclina tem sido muito difundido, no entanto não há trabalhos indicando o nível de concentrações residuais do antibiótico em campo e seu potencial impacto sobre a flora bacteriana (Montoya & Uyaguari, 2003).

2.1. Residualidade nos Ecossistemas e Resistência Bacteriana

Nos sedimentos aquáticos, a comunidade microbiana degrada a matéria orgânica e recicla nutrientes no meio. Parte do consumo de oxigênio, redução de amônia e nitrito nestes ambientes são todos altamente dependentes da atividade desses microrganismos. O acúmulo

de resíduos antibacterianos em sedimentos naturais, ou em viveiros de cultivo, tem a capacidade de inibir esta atividade e reduzir os índices de degradação da matéria orgânica. As conseqüências nos ecossistemas, porém, são ainda desconhecidas. Provavelmente ocorre acúmulo de matéria orgânica, provocando acidez no sistema, ou mesmo seletividade da fauna microbiana resultante da resistência natural à droga, por determinados microrganismos.

Químicos lançados nos ambientes naturais, por meio dos efluentes da atividade aquícola, podem ser severamente tóxicos, mutagênicos ou apresentarem outros efeitos subletais negativos na fauna e flora nativas (Gräslund & Bengtsson, 2001). A persistência desses químicos, ou de seus subprodutos, pode ocorrer através da bioacumulação, biomagnificação ou pelo transporte físico através do ar, água ou solo (Gräslund *et al.*, 2002).

Poucos estudos associam a interferência desses compostos sobre a atividade microbiana. Capone *et al.* (1996) descobriram que resíduos de oxitetraciclina acima de 7 mg.k^{-1} em sedimentos, não tinham qualquer efeito sobre a densidade e a atividade bacteriana, embora informações a respeito de possíveis mudanças na ecologia da comunidade não terem sido examinadas. Por sua vez, existem registros de patógenos resistentes à oxitetraciclina em sedimentos de fazendas localizadas na Finlândia, onde peixes são cultivados e tratados com este antibiótico (Björklund *et al.*, 1991).

Além de apresentarem certo grau de toxicidade, a maioria das drogas aplicadas na medicina veterinária tem demonstrado alto grau de residualidade e persistência em sedimentos marinhos e estuarinos. Segundo Oka *et al.* (1989) e Samuelsen (1989), as tetraciclina diluídas em água são degradadas por fotodecomposição e as meias-vidas são dependentes da temperatura, pH, saturação de gases e intensidade de luz. A degradação da oxitetraciclina na água, por sua vez, é mais rápida do que no sedimento (Björklund *et al.*, 1991). Por serem hidrossolúveis, comumente torna-se necessária a aplicação de doses terapêuticas mais elevadas, quando se utiliza tratamento em banhos, do que na administração da droga via oral ou intravenosa.

Ao agrupar e analisar dados publicados por diversos autores, Smith & Samuelsen (1996) observaram variações extremas entre 9-415 dias de meia-vida de residualidade de oxitetraciclina em sedimentos, sob gaiolas de salmões submetidos a tratamento na Irlanda. Os valores nesses campos variavam de $0,1-11,0 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ como concentrações mínimas até $285 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$. Teoricamente, os autores presumiam que o antibiótico retido no sedimento,

oriundo das gaiolas com salmões medicados, passava para a coluna d'água via lixiviação, mas o fenômeno ocorreria essencialmente, quando a concentração no sedimento fosse elevada e a meia-vida de persistência curta; entretanto, situações improváveis poderiam ocorrer. Segundo CENAIM (2002), os antibióticos oxitetraciclina e certas quinolonas apresentam residualidade acima de 180 dias em sedimentos. Tal residualidade, provavelmente variará conforme as condições ambientais, existindo estreita relação entre o antibiótico diluído na coluna d'água e aquele disperso no sedimento.

Smith *et al.* (1994) investigaram a influência de sistemas de tratamento na recuperação de efluentes contaminados com resíduos de oxitetraciclina. Conforme referido pelos autores, quase a totalidade do antibiótico lançado em berçários foi retido num filtro de 50 µm e nenhum resíduo foi detectado no efluente tratado até o limite de 0,02 µg OTC.mL⁻¹. Por outro lado, a instalação de tanques de sedimentação removeu o resíduo com maiores variações e menor eficiência (12-92%). O modelo estudado demonstra que sistemas de tratamento de efluentes, tecnicamente eficientes, podem funcionar como redutores de riscos ambientais nas fazendas de cultivo e ecossistemas vizinhos.

2.2. Tratamento e Residualidade em Organismos Cultivados e Espécies Silvestres

Os agentes quimioterápicos atuam pela interferência no crescimento dos microorganismos nocivos, sem prejudicar o hospedeiro; este é o princípio da toxicidade seletiva (Tortura *et al.* 2002). Ao serem empregados nos sistemas de produção, as drogas quimioterápicas acumulam-se no tecido animal, em concentrações suficientes à redução do patógeno ou sua completa eliminação. Entretanto, resíduos da droga, que comumente lixiviam para o ambiente aquático, podem fluir das instalações de produção através dos efluentes, ou pelas linhas de esgoto em casos específicos, alcançando os ecossistemas vizinhos onde podem interagir com o meio abiótico e ou atingir a fauna e flora nativas. Além disso, rações medicadas não ingeridas ou fezes contendo resíduos de drogas podem ser consumidas pela fauna local, incorporando o medicamento (GESAMP, 1997); da mesma forma, organismos filtradores como moluscos podem estar vulneráveis devido à presença de partículas contaminadas.

Quando adicionada na alimentação animal, as tetraciclina suprimem a microbiota da flora intestinal, podendo inclusive resultar em um significativo ganho de peso. No

entanto, há registros de alguns problemas de saúde em consumidores destes animais. O uso de antibióticos na alimentação dos animais pode levar ao crescimento de linhagens de bactérias que são resistentes às drogas normalmente empregadas no tratamento de infecções humanas (Tortura *et al.*, 2002).

Corlis (1979) desenvolveu os primeiros estudos de residualidade do antibiótico oxitetraciclina em camarões, utilizando espécimes juvenis nativos de *Litopenaeus setiferus*. Dosagens de tratamento, 1, 5 e 10g OTC.kg⁻¹ de ração, durante três semanas, foram oferecidas a animais mantidos em séries de tanques. Ao empregar o método de difusão microbiológica em placas, utilizando o organismo-teste *Bacillus cereus*, esse pesquisador registrou níveis de oxitetraciclina no tecido abdominal entre 24 e 48 horas. Concentrações máximas no tecido dos camarões analisados atingiram 1,05 µg OTC.mL⁻¹ no 1º. grupo de animais e 0,88 µg.mL⁻¹ no 2º. grupo. Picos máximos foram alcançados em datas distintas do período de tratamento e ocorreram tanto no início como no final da medicação, independentemente da dosagem empregada. No período de pós-tratamento, o autor registrou residualidade zero em três dias nos animais medicados com a menor dosagem, mas definiu residualidade por tempo indeterminado em um dos tratamentos a 10 g.kg⁻¹. Segundo o autor, doses terapêuticas de 5g OTC.kg⁻¹ de ração, durante 14 dias, seriam suficientes no tratamento contra *Vibrio* spp.

O estresse, conseqüência de mudanças ambientais, pode reduzir significativamente o consumo de ração medicada e ou afetar a absorção da droga pelos animais testados, resultando em níveis baixos de retenção nas condições de experimento.

Björklund *et al.* (1991) analisaram a residualidade do ácido oxálico e da oxitetraciclina em peixes e sedimentos de cinco fazendas produtoras localizadas no Mar Báltico, costa sudoeste da Finlândia. Trutas arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, foram cultivadas em gaiolas flutuantes em ambiente de água salobra com salinidade de 0,6% e temperatura variando de 15-18°C. Nas gaiolas, os peixes foram medicados durante dez dias com doses terapêuticas, que variaram entre 85 e 110 mg.kg⁻¹ de peso corporal dia, segundo o manejo de cada produtor. O composto ácido oxálico, segundo os pesquisadores, foi melhor absorvido pelos organismos tratados, contudo, excretado mais rapidamente em comparação à oxitetraciclina, refletindo em um poder residual mais acentuado do último fármaco. A concentração máxima de ácido oxálico detectada por cromatografia líquida no tecido muscular dos peixes variou de 1,2 a 2,9 µg.g⁻¹, superiores, portanto, aos registrados para

a oxitetraciclina, entre 0,8 e 1,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Em uma das fazendas estudadas, a eliminação total da oxitetraciclina ocorreu no intervalo de 25-30 dias com uma meia-vida de 5,6 dias.

Submetendo ao mesmo sistema de tratamento anteriormente referido, Malvisi *et al.* (1996) estudaram a distribuição tecidual e depleção residual da oxitetraciclina na dourada, *Sparus aurata*, e no robalo europeu, *Dicentrarchus labrax*, espécies bastante cultivadas na costa oeste europeia. Os indivíduos foram mantidos em gaiolas flutuantes situadas na Laguna de Grado, na Itália, em águas com salinidade a 35‰ e temperatura variando entre 19 e 28°C. Após uma semana de aclimação e dois dias de inanição, os animais foram medicados oralmente com ração contendo 7,5 g de oxitetraciclina por quilograma de alimento na razão de 1,0% da biomassa, durante 14 dias. Empregando cromatografia líquida em suas análises, os autores observaram maior acúmulo do composto na pele ($7,70 \pm 6,71 \mu\text{g.g}^{-1}$) e fígado ($14,65 \mu\text{g.g}^{-1}$) no 6º. dia de tratamento. As vértebras incorporaram até seis vezes mais do que o músculo, que apresentou a menor residualidade, havendo traços persistentes do composto no 40º. dia no pós-tratamento, ao nível de $1,73 \pm 0,92 \mu\text{g.g}^{-1}$. As concentrações de oxitetraciclina no músculo foram menores do que nos outros tecidos durante o período da investigação, reduzindo para $0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$, 20 dias depois do tratamento.

Estudos comparativos da contaminação e descontaminação da ostra japonesa *Crassostrea gigas* e do mexilhão *Mytilus edulis*, em ambiente salino com oxitetraciclina e ácido oxálico foram desenvolvidos por Pouliquen *et al.* (1996). Após dez dias de exposição em água salina, apresentando 0,15 e 1,50 mg OTC.L⁻¹, os níveis de oxitetraciclina e ácido oxálico no tecido desses bivalves foram respectivamente 0,09 a 0,16 e 0,70 a 1,40 mg.kg⁻¹. As ostras testadas foram estocadas e mantidas em ambiente de laboratório. Os parâmetros físico-químicos monitorados foram temperatura ($12,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), pH ($8,0 \pm 0,2$), salinidade ($33,0 \pm 0,5\text{‰}$) e oxigênio dissolvido conservado acima dos índices de saturação. Semelhante aos resultados obtidos por Björklund *et al.* (1991), ao analisar a residualidade em trutas, os autores verificaram decréscimo mais lento da concentração de oxitetraciclina no tecido dos moluscos, durante o período de pós-tratamento, quando comparado ao ácido oxálico, sendo detectado traços de oxitetraciclina pelo menos até o sétimo dia de descontaminação.

Capone *et al.* (1996) encontraram resíduos de oxitetraciclina, em média $0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ em ostras da espécie *Crassostrea gigas* e caranguejos *Cancer magister* coletados próximos às fazendas produtoras de salmão cultivados em gaiolas. No estudo, metade dos caranguejos

vermelhos *Cancer productus* capturados abaixo das gaiolas, durante os 12 dias de tratamento com oxitetraciclina continham concentrações no tecido de 0,8 a 3,8 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Ao submeter camarões azuis do Pacífico, *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874), a tratamento com oxitetraciclina, na dosagem 1,5 g OTC.kg⁻¹ de ração, em tanques de 1.500 litros, Mohny *et al.* (1997) registraram acumulação de 3,3 $\mu\text{g.g}^{-1}$ do fármaco no tecido abdominal dos animais em 4 dias de medicação. Da mesma forma que Corlis (1979), os autores aplicaram o método de difusão microbiológica em placas. Durante o período de 4 a 14 dias de tratamento, os níveis acumulados no tecido mantiveram-se entre 3,3 e 5,2 $\mu\text{g.g}^{-1}$, ou seja, valores superiores àqueles considerados como Concentração Inibitória Mínima-CIM de 2,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para 13 espécies de bactérias sensíveis ao fármaco, isoladas de camarões enfermos. A partir do quinto dia após cessado o tratamento, foram observadas concentrações médias de 0,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$ no tecido animal, constituindo-se valores abaixo do limite de detecção estimado para a metodologia empregada.

Aplicando a cromatografia líquida, Bermúdez-Almada *et al.* (1999) estimaram o período de depuração do antibiótico oxitetraciclina no camarão da espécie *L. vannamei*, mantidos em aquários. Durante a investigação, a temperatura ambiente variou entre 18^oC e 24^oC e a iluminação fluorescente pelo período de 12 h. Três dietas medicadas contendo 0,1, 0,25 e 0,5 g OTC.kg⁻¹ de ração foram testadas e oferecidas por 21 dias. Uma dieta livre de oxitetraciclina funcionou como controle. No sétimo dia de depuração, período de eliminação da droga, foram registradas concentrações de 0,05, 0,19 e 0,28 $\mu\text{g.g}^{-1}$ no tecido abdominal. Semelhante a outros estudos, observou-se acentuado desvio-padrão nas concentrações das amostras durante a fase de tratamento. A recuperação (“recovery”) e o limite de detecção estimados para o método foram 95-110% e 0,05 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente.

Ensaio desenvolvidos por Onkong *et al.* (2000) permitiram analisar os níveis de absorção e depuração da oxitetraciclina no tecido abdominal, hepatopâncreas e carapaça da espécie *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798), vulgarmente conhecido por tigre negro asiático, submetidos a tratamento em uma concentração de 5 g.kg⁻¹, por 7 dias. Os autores relataram que a concentração no hepatopâncreas, medida em HPLC, decresceu de aproximadamente 19,0 a 2,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$ dentro de 7 dias do período de eliminação. Finalizados os ensaios, camarões cultivados em tanques de cimento e em pequenos viveiros (densidade média entre 30-35 camarões.m⁻²), apresentaram tecidos abdominais livres de resíduos detectáveis entre 17 e 14 dias, respectivamente.

Camarões de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, vulgarmente conhecido como gigante da Malásia, foram testados por Brillantes *et al.* (2001). Os pesquisadores investigaram a distribuição da oxitetraciclina no abdômen e cefalotórax de machos e fêmeas da espécie, após tratamento com ração medicada a 2,5 e 5,0 g.kg⁻¹ de ração por 7 dias. As análises foram realizadas aplicando a técnica de cromatografia líquida, extração em fase sólida e detecção por fluorescência, sendo as amostras mantidas congeladas a -20°C até a análise. Indivíduos em lotes de tratamento a 5 ppt apresentaram uma maior residualidade no cefalotórax e abdômen do que os indivíduos no lote submetido a 2,5 ppt. Níveis do antibiótico no cefalotórax em ambos os sexos foram significativamente superiores aos do abdômen ($P < 0,05$), atingindo picos máximos em todos os grupos de indivíduos entre 4 – 6 dias de medicação. Cessado o tratamento, treze e dez dias foram suficientes para reduzir a oxitetraciclina aos níveis de segurança no cefalotórax e músculo, respectivamente, em ambos os sexos, indiferentemente, não ocorrendo diferença significativa ($P < 0,05$) no mesmo tecido entre machos e fêmeas. Uma vez que variações na temperatura da água, dosagem do fármaco, duração da terapia e outras condições ambientais podem interferir na incorporação e eliminação da droga, os autores recomendaram um período de 21 dias de supressão, necessários para eliminação do antibiótico.

Inclusão de oxitetraciclina em dietas artificiais em doses 0,81, 4,47 e 9,52 ppt geraram acumulações máximas de 3,1 , 12,2 e 16,6 ppm, respectivamente, no tecido muscular do camarão cinza, *L. vannamei*, no 5º. dia de medicação (Montoya & Reyes, 2002); os dias restantes de tratamento (9 dias) serviram apenas para a manutenção da concentração do fármaco no tecido animal. A dieta formulada CENAIM-40, aplicada no tratamento, não reduziu significativamente ($P < 0,05$) a palatabilidade nos níveis de dosagens testadas, contudo, observou-se sensível relação inversa entre o consumo e a dosagem de oxitetraciclina no alimento. Os camarões foram testados em tanques de fibra de vidro com 37 animais.m⁻² com 200% de renovação da água, diariamente. Ao longo do período de administração da droga (14 dias), as concentrações médias mensuradas no tecido foram 2,6, 9,1 e 14,1 ppm nos três níveis de tratamento. Desta forma, os investigadores observaram não haver aumento dos níveis de oxitetraciclina no músculo dos camarões testados na mesma magnitude de acréscimo do fármaco na dieta medicada (dosagem). Ou seja, em todos os tratamentos pôde ser observado que o comportamento acumulativo da oxitetraciclina, no músculo de *L. vannamei*, não foi doso-dependente. Da mesma forma, a velocidade como o antibiótico foi eliminado pelos animais, não teve relação com os níveis

de oxitetraciclina acumulados durante o tratamento. Segundo os autores, a espécie *L. vannamei*, comparada a outros peneídeos já estudados, parece reduzir a capacidade de acumular oxitetraciclina no tecido à medida que se incrementa a dose terapêutica. Durante a fase de pós-tratamento, as concentrações mínimas observadas foram: 0,07 ppm em 7 dias de eliminação (dosagem 0,81 ppt), 0,13 ppm em 10 dias (dosagem 4,47 ppt) e 0,17 ppm em 10 dias (dosagem 9,52 ppt).

No mesmo estudo, Montoya & Reyes (2002) investigaram ainda as perdas ocorridas durante a fabricação da ração artificial, ocorridas principalmente no processo de secagem, e a intensidade da lixiviação no meio aquático. A taxa de lixiviação demonstrou ser mais acentuada nas primeiras duas horas de imersão da ração medicada lançada em água salina, alcançando perdas médias de 27% do fármaco e 38% de perda em 6 horas. Segundo o autor, a salinidade influencia acentuadamente a lixiviação da oxitetraciclina, devido à sua afinidade com os íons Ca^{++} e Mg^{++} disponíveis no meio, elementos que desempenham papel importante no processo. Björklund *et al.* (1991) também referem-se à combinação com os íons Fe^{++} . Outros componentes abióticos existentes no ambiente aquático ou sedimento dos viveiros, provavelmente interagem paralelamente. A velocidade de lixiviação do fármaco em água doce, comparada à água com teores salinos mais elevados, foi expressivamente inferior.

Pesquisas sugerem o emprego de antibióticos utilizando alimentos vivos como veículo (bioencapsulação), uma vez que não são plenamente conhecidas as porções incorporadas pelos camarões alimentados com rações medicadas. Quando lançada na água, apenas uma porção torna-se biodisponível, sendo a maior parte ligada aos sais de cálcio e magnésio livres no meio aquático (Cuenca *et al.*, 2002). Estes autores testaram doses terapêuticas em pós-larvas de *L. vannamei* incorporadas sob três formas: (1) animais alimentados com náuplios de *Artemia franciscana* enriquecida com oxitetraciclina a 19 mg.kg^{-1} de ração (com adição de enriquecimento com emulsão lipídica comercial para *Artemia*; (2) sem adição de enriquecimento e (3) antibiótico aplicado diretamente na água do mar (banho convencional a 20 ppm OTC). A maior incorporação de fármaco no tecido das pós-larvas foi registrada no tratamento com banho convencional. Finalizado o tratamento em 7 dias, as determinações do antibiótico foram as seguintes: sem enriquecimento $5,77 \pm 0,6 \text{ } \mu\text{g}$, com enriquecimento $18,98 \pm 2,8 \text{ } \mu\text{g}$ e banho $26,3 \pm 8,1 \text{ } \mu\text{g}$ por grama de extrato de camarão. A adição da emulsão enriquecida acentuou a incorporação.

Gillies *et al.* (1991) definem farmacocinética o estudo do desenvolvimento temporal da absorção, distribuição, metabolização e excreção de drogas, bem como da resposta farmacológica correspondente. A extensão conceitual e a complexidade de sistemas envolvidos no processo provavelmente justificam a carência de investigações análogas em camarões peneídeos. Reed *et al.* (2004), porém, iniciaram os primeiros estudos envolvendo a farmacocinética do composto oxitetraciclina em peneídeos, desenvolvendo ensaios empregando a hemolinfa do camarão branco *Litopenaeus setiferus*. Os autores tinham como objetivo otimizar a dosagem e possibilitar o controle mais efetivo das enfermidades, ao mesmo tempo em que se minimizariam os resíduos ambientais. Para conduzir o projeto, foram desenvolvidas técnicas de baixa e alta dosagem intravascular aplicando métodos de amostragem com sobrevivência. Com isto, o estudo demonstrou que doses mais elevadas da oxitetraciclina não alteraram significativamente os parâmetros farmacocinéticos analisados, indicando que a distribuição do composto no camarão é linear e não doso-dependente. Os níveis de oxitetraciclina na hemolinfa e tecido foram analisados por cromatografia líquida e adequado ao modelo farmacocinético apropriado para caracterizar a distribuição do antibiótico no camarão.

Em substituição aos antibióticos, Boyd & Laurence (1999) defendem a adição de inóculos vivos de bactérias selecionadas (probióticos) na aquicultura. Entre os benefícios em potencial, incluem: intensificação da decomposição da matéria orgânica, redução da concentração de compostos nitrogenados e fósforo, melhor crescimento algal, maior disponibilidade de oxigênio dissolvido, redução de algas azuis e verdes, controle de amônia, nitrito e sulfeto de hidrogênio; menor incidência de enfermidades e maior sobrevivência; maior produção na aquicultura. O princípio baseia-se na exclusão competitiva e envolve o uso de bactérias vivas ou leveduras na dieta ou na água de cultivo, para assegurar que o trato digestório da espécie cultivada seja inicialmente colonizado com microorganismos benéficos, que melhoram a digestão (GESAMP, 1997). Apesar dos mecanismos de ação de probióticos serem pouco conhecidos, seu complemento na aquicultura, aparentemente não resulta em danos aos animais cultivados, ou ao meio ambiente, pois não são conhecidos riscos à segurança dos alimentos em consequência de sua aplicação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desenho Experimental

3.1.1. Local dos Estudos

A primeira etapa de testes ocorreu sob condições controladas em laboratório no Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará. Em uma segunda etapa, experimento semelhante foi conduzido em uma fazenda de engorda de camarão marinho em zona estuarina situada no Município de Beberibe, Estado do Ceará.

3.1.2. Modos Operacionais

Camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) foram mantidos durante o período experimental em 6 tanques de fibra de vidro de 500 litros, numa densidade de 52,16 camarões.m², sendo cada tanque povoado com indivíduos com aparência saudável, apresentando peso médio de 5,08 gramas (SD ±0,633). Duas séries de três tanques foram empregadas: T₁, T₂ e T₃ com animais alimentados com ração contendo oxitetraciclina-base (bateria-tratamento) e C₁, C₂ e C₃, com animais submetidos ao mesmo tipo de ração, mas com ausência do fármaco (bateria-controle).

Baseado no manejo de águas em sistema fechado referido por Spotte (1979), com adaptações, em cada série de tanques, bombas centrífugas conectadas a tubos PVC promoviam a recirculação da água de forma sistemática, numa vazão de 600 litros.h⁻¹. Filtros biológicos externos compostos por camadas de cascalho de ostras, brita e areia retinham o material em suspensão e promoviam a manutenção da qualidade da água utilizada em ambos os sistemas, em níveis compatíveis com a espécie, durante o ciclo de investigação. Sistema de aeração por compressor, acoplado às baterias-tratamento e controle, permitiu a manutenção do oxigênio dissolvido em níveis aceitáveis (Figura 1).

Para o estudo em campo, gaiolas construídas em tela nylon 1.000 µm, com área de fundo 1,1 m², foram instaladas em um viveiro de camarão situado em zona estuarina, fixadas em contato com o solo. As gaiolas foram povoadas com indivíduos apresentando peso médio 5,18 gramas (SD ±0,70), numa densidade de 50 camarões.m², que receberam tratamento antibiótico (gaiolas G₁, G₂ e G₃), semelhante àquele submetido aos indivíduos

testados em regime de laboratório (Figura 2). Animais da gaiola-controle (G_{controle}) receberam apenas ração não medicada.

Dados das variáveis físico-químicas: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), salinidade (‰), oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}), pH e luminosidade (Lux) foram observados diariamente no sistema implantado em laboratório e no viveiro. A luminosidade em campo foi registrada semanalmente. Empregando o oxímetro digital Bernauer YSI 55/12 FT, pôde-se mensurar o oxigênio dissolvido e a temperatura na meia coluna d'água dos tanques e gaiolas no viveiro. Pequenos frascos de vidro protocolados foram utilizados na coleta e medição do pH, empregando o equipamento MA-PA 2009 Marconi. Refratômetro modelo SR1 (20 x 4 cm) foi utilizado na medição da salinidade. A Luminosidade incidente sobre a superfície d'água em ambos ambientes experimentais, campo e laboratório, foi observada empregando o luxímetro digital modelo MLM-1332 Minipa (variação 200-200.000 Lux).

Amônia (mg.L^{-1}) e nitrito (mg.L^{-1}) foram monitorados com frequência semanal nos tanques de testes, filtros biológicos e viveiros. A medição da amônia solúvel (NH_3) foi realizada através do método Nesslerização Direta e o nitrito (NO_2^-) por Sulfanilamida – NED.



Figura 1. Sistema de tanques empregados no tratamento antibiótico dos camarões estocados em laboratório.



Figura 2. Gaiolas empregadas no tratamento antibiótico dos camarões investigados em viveiro.

Durante a fase de investigação, foram registradas as mortalidades por tanque e gaiola e anotadas as ocorrências de ecdises.

3.2. Regime de Tratamento

Antecedendo ao tratamento, camarões estocados nos tanques e gaiolas passaram por um período de aclimação de 10 dias, quando foram alimentados somente com ração não medicada. A ração Camaronina-35 da Agribands Purina do Brasil Ltda (Tabela 1) foi oferecida na razão de 5% da biomassa inicial, dividida em três refeições/dia, nos horários 08:00 horas, 12:00 horas e 17:00 horas, diariamente. Finalizado o período de aclimação, todavia obedecendo ao mesmo regime de alimentação, os animais estocados na bateria de tanques-tratamento (T_1 , T_2 e T_3) e gaiolas-tratamento (G_1 , G_2 e G_3) passaram a receber exclusivamente ração medicada com o composto oxitetraciclina-base Reiza-Kern (pureza 96,53%) na dosagem de 4 ppt por 14 dias, dosagem e tempo padrões adotados no tratamento de NHP (Hepatopancreatite Necrosante) em peneídeos no Brasil. A incorporação do fármaco à ração teve como base a metodologia descrita por Brock & Main (1994). Utilizando um conta-gotas, pequena quantidade de óleo de peixe levemente aquecido (37-38°C) era misturado suavemente com 62,0 mg de oxitetraciclina em um becker 50 mL.; em seguida, 15 g de ração eram lançadas sobre o óleo e misturadas até homogeneização, sendo então mantidas em repouso por 5 minutos até a oferta. Camarões estocados nos tanques-controle (T_{controle}) e gaiola-controle (G_{controle}) receberam somente ração não medicada, sendo apenas banhada em óleo de peixe, durante o ciclo de investigações.

Decorridos 30 minutos após a distribuição da ração, as porções não consumidas eram coletadas e em seguida pesadas. Testes de intumescimento foram realizados para conhecer a porção seca da ração não consumida. Para isto, doze amostras de ração pesando 1,0 g cada, banhadas em óleo, foram imersas na água do sistema em tanque e viveiro; após trinta minutos, a ração foi novamente pesada e quantificada a umidade acrescida, que foi 31,11% (laboratório) e 36,31% (viveiro). Para se obter a sobra seca, multiplicou-se a ração não consumida por 68,89% (laboratório) e 63,69% (viveiro) que, pela diferença da ração distribuída, permitiu quantificar a porção consumida pelos camarões. Multiplicando-se a porção consumida pelo fator 0,004, obtinha-se a quantidade do antibiótico assimilado. O fator mencionado origina-se da dosagem de tratamento aplicada (4g OTC.kg⁻¹ de ração). Em 1.000g ração há 4g de OTC, então, cada 1 g de ração contém 0,004 g de OTC. Multiplicando-se a ração consumida pelo fator mencionado (0,004), obtém-se, por conseguinte, a quantidade de oxitetraciclina assimilada.

Tabela I. Níveis de garantia da ração Camaronina-35 (Agribands Purina do Brasil Ltda), administrada no tratamento antibiótico.

Composição	Níveis de Garantia (%)
Umidade	13,0 *
Proteína Bruta	35,0 **
Extrato Etéreo	8,0 **
Fibra	6,0 *
Cinzas	13,0 *
Cálcio	3,0 *
Fósforo	0,7 **
Elementos Minerais	Níveis de Garantia (mg)
Magnésio	0,40
Manganês	10,00
Cobre	50,00
Zinco	100,00
Iodo	0,30
Selênio	0,15

* Níveis máximos

** Níveis mínimos

Fonte: Purina

3.3. Frequência e Técnica de Amostragem

Datas de amostragens, a partir do primeiro dia de tratamento foram arbitradas acompanhando o seguinte cronograma: D₁ (início do tratamento), D₃, D₅, D₇, D₁₀ e D₁₄ (final do tratamento). A fim de se estimar o tempo de residência do fármaco no tecido animal, cessado o tratamento, novo ciclo de amostragens em intervalos semelhantes prosseguiu até atingir os níveis mínimos de detecção e quantificação estimados para a metodologia. Três camarões coletados aleatoriamente compunham uma única amostra representativa por tanque, totalizando 18 indivíduos coletados em cada data amostral (6 tanques X 3 indivíduos amostrados por tanque). Objetivando minimizar possível interferência provocada por metabolização, diluição e ou dissipação do antibiótico no tecido animal, após a coleta, os camarões amostrados eram imediatamente sacrificados em imersão de água e gelo salinos

por 15 minutos, utilizando água coletada do próprio sistema. Em seguida, após acondicionamento em sacos polietileno escuros para impedir a incidência de luz, o material coletado era devidamente protocolado e mantido congelado a -20°C , evitando a deterioração da oxitetraciclina.

3.4. Análise das Amostras

3.4.1. Reagentes e Soluções

Os solventes e demais compostos empregados na extração e composição da fase móvel foram de grau analítico para cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE, adquiridos da Acroos. A água utilizada na composição das soluções e demais procedimentos foi deionizada (tipo Milli-Q). Cloridrato de oxitetraciclina, pureza Acroos 99,9%, foi utilizada na combinação das soluções-padrão e construção da curva de calibração.

3.4.2. Preparação das Amostras e Técnica de Extração

Até 12 horas após a coleta eram realizados os procedimentos de extração e análise em laboratório no Centro de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Fortaleza/UNIFOR. Para a extração, foi adotada a metodologia descrita por Reed *et al.* (2004), com ajustes aos equipamentos e materiais disponíveis.

Inicialmente, as amostras eram descongeladas naturalmente. Partes do tecido abdominal dos animais coletados em cada um dos tanques eram misturadas e então maceradas. Utilizando um homogeneizador “potter” B. Braun Melsungen 30CC com pistilo, 1 g do macerado era levemente homogeneizado durante 3 minutos em 10 mL de solução-tampão (0,05% EDTA-McIlvaine a 30% MeOH) e mantido sob refrigeração. A solução-tampão foi ajustada para pH 4 e estocada sob refrigeração. Finalizada a homogeneização, todo o material era transferido para tubos de centrífuga 15mL. Para promover a precipitação das proteínas contidas no tecido foram adicionadas 20 gotas de ácido tricloroacético (1:1) ao extrato e agitado intensamente. A precipitação e aglutinação das proteínas ocorriam após a

imersão do homogeneizado em banho de água fria e gelo por 15 minutos. Finalmente, o homogeneizado era centrifugado a 11.000 rpm por 15 minutos a 4°C.

Utilizando seringas Hamilton-3mL com filtros 0,2 µm à base de acetato de celulose, foram injetados 100 µL do sobrenadante no equipamento de cromatografia. Todas as injeções foram realizadas em triplicata. A temperatura ambiente variou entre 20-25°C, durante os procedimentos de extração e análise, sendo também evitada a incidência de luz natural e artificial sobre as amostras.

3.4.3. Condições Analíticas

As análises foram realizadas empregando um aparelho de cromatografia líquida modelo Gilson 321 provido de um detector ultravioleta UV/VIS-152 “Detector Gilson” com leitura a 365 nm, ativado pelo programa Unipoint 3.0 Software. Pré-colunas Hichrom-5 C₁₈-10C acopladas a colunas Hichrom-5 C₁₈ fase reversa (25 cm x 4,6 mm id; “end capped”) compunham a fase estacionária. As amostras injetadas eram eluídas na seguinte fase móvel: ácido oxálico 0,01M / acetonitrila / metanol / tetrahydrofurano (24:6:3:2), com fluxo 1,0 mL.min⁻¹.

O conhecimento do tempo de retenção, revelado pela solução-padrão injetada, permitiu a identificação do pico da oxitetraciclina contida nas amostras.

3.4.4. Validação Estatística

3.4.4.1. Recuperação

A recuperação permite avaliar a eficiência da metodologia de extração do antibiótico oxitetraciclina no tecido animal, empregada nas análises. A eficiência é dependente de vários elementos que, em conjunto, sensibilizam os resultados. A calibração do equipamento cromatográfico e composição da coluna utilizada, pureza dos reagentes, homogeneização manual, até mesmo padronização e habilidade do técnico, são alguns dos fatores que podem interferir na eficiência de extração.

Para determinação da recuperação 1,0 g de tecido muscular de camarão livre de oxitetraciclina foi macerado em 0,5 mL de solução-padrão a 10 ppm de OTC, empregando-se um homogeneizador “potter” 30CC com pistilo. Posteriormente, 9 mL de solução-tampão 0,05% EDTA-McIlvaine a 30% MeOH foi adicionado e homogeneizado durante 3 minutos- mesmo tempo dispensado à fase de extração das amostras coletadas. Finalizada a homogeneização, todo o material foi transferido para tubos de centrífuga com 15mL de volume. 20 gotas de ácido tricloroacético (1:1) foram adicionadas a cada tubo e agitados intensamente. Antes da centrifugação a 11.000 rpm a 4°C por 15 minutos, os tubos repousaram em banho de gelo por 15 minutos.

Empregando seringas Hamilton-3mL com filtros 0,2 µm à base de acetato de celulose, foram injetados em triplicata no equipamento de cromatografia: 100 µL do sobrenadante extraído; 100 µL de solução-padrão a 10 ppm de OTC preparado de forma semelhante à recuperação, contudo sem adição de tecido; 100 µL de água Milli-Q a 0,0 ppm (branco). Tabulados os resultados, pôde-se determinar o índice de recuperação da oxitetraciclina contida no tecido animal, padronizado conforme a técnica de extração empregada.

3.4.4.2. Curva de calibração

O desenvolvimento da curva de calibração permite mensurar a correlação existente entre, a área do pico formada no equipamento cromatográfico e a concentração de oxitetraciclina em soluções previamente preparadas. Para isto, 10 mg de oxitetraciclina-HCl padrão Merck (pureza 99,9%) foi adicionada em 100 mL de água bidestilada Milli-Q, formando uma solução-estoque com concentração 100 ppm. Com o propósito de minimizar erros de manipulação e variações, mesmo pequenas, provocadas por diferenças no volume de vidrarias utilizadas, a solução-estoque foi conservada refrigerada por todo o período de análise e empregada na formulação das soluções-padrão da curva de calibração. Seis concentrações foram pré-estabelecidas para a construção da curva: 0,0 ppm (branco), 10,0 ppm, 2,5 ppm, 0,625 ppm, 0,156 ppm e 0,039 ppm. Cada concentração foi produzida em seis repetições, sendo injetadas em triplicata e obtida a curva de calibração apresentada na Figura 3.

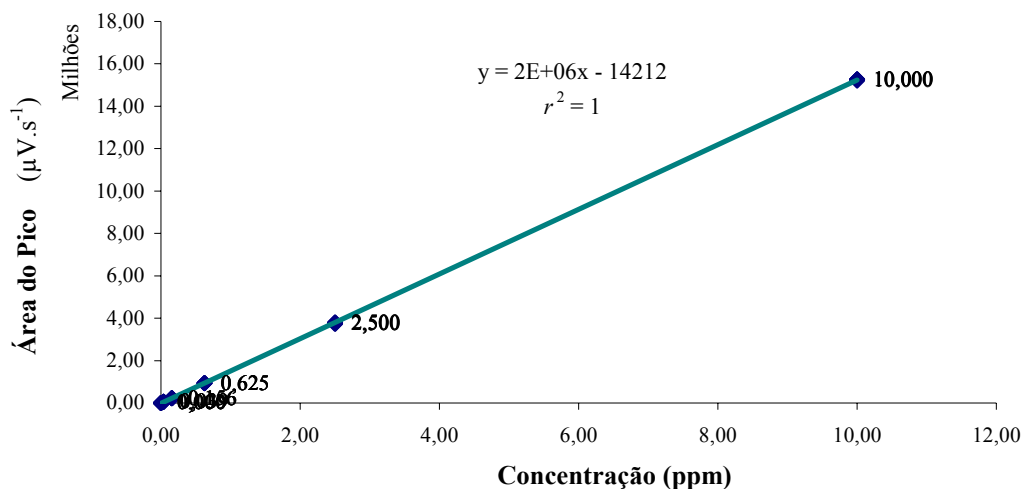


Figura 3. Curva de calibração das soluções-padrão injetadas no equipamento de cromatografia líquida (volume injetado 100μL).

Verificada a correlação linear ($r^2 = 1,0$) entre as variáveis “concentração” e “área do pico”, foi aplicada a análise de variância dos dados (ANOVA) a fim de se determinar a função da reta representativa da correlação, bem como estimar os limites de detecção e quantificação da metodologia adotada, expressos na unidade de $\mu\text{g.g}^{-1}$.

$$Y = 0,0093 + 6,55 \cdot 10^{-7} \cdot X,$$

$$LD = 0,0573$$

$$LQ = 0,1552$$

Onde: "Y" é a concentração do composto em função da área do pico "X" gerada no equipamento de cromatografia. **LD** e **LQ** são os limites de detecção e quantificação estimados, respectivamente.

Desta forma, à medida que se procediam as análises, a área de pico gerada no equipamento era lançada na função e determinada a concentração do fármaco observada na amostra. Ao ajustar esta concentração multiplicando-se pelo índice de recuperação referido no item 3.4.4.1, obtinha-se a concentração real de oxitetraciclina no tecido abdominal do camarão analisado.

Então, temos a equação:

$$[\mathbf{Real}] = [\mathbf{Extração}] \times (100/\mathbf{Recuperação})$$

onde, **[Real]** é a concentração de oxitetraciclina na amostra analisada e **[Extração]**, a concentração lida no equipamento de cromatografia líquida.

4. RESULTADOS

A sobrevivência dos animais em ambos os ambientes experimentais - em laboratório utilizando tanques de fibra e campo, empregando gaiolas no viveiro - foi bastante significativa, variando de 94 a 98% e de 91 a 100%, respectivamente. Durante o estudo não foram observadas alterações quanto à mobilidade dos camarões, mantendo-se aparentemente saudáveis, sem sintomas de enfermidades ou redução do consumo alimentar, quando comparados aos controles. Os parâmetros biológicos observados durante a investigação são apresentados na Tabela II.

Tabela II. Parâmetros zootécnicos dos estudos realizados em laboratório e em campo com o camarão *L. vannamei*, registrados durante um período de tratamento de 14 dias.

Parâmetro	Laboratório				Campo			
	T ₁	T ₂	T ₃	C controle *	G ₁	G ₂	G ₃	G controle
No. inicial de camarões	52	53	52	51,67	55	55	55	55
Peso médio inicial (g)	5,23	5,00	4,89	5,07	5,58	4,78	5,80	5,65
Densidade inicial (camarões.m ⁻²)	52	53	52	51,67	50	50	50	50
Biomassa inicial (g)	271,96	265,00	254,28	261,97	306,90	262,90	319,00	310,75
Consumo de ração (g)	77,57	64,95	68,35	71,24	73,62	47,22	52,88	44,25
Consumo de OTC (mg)	0,31028	0,25980	0,27340	-	0,29448	0,18888	0,21152	-
Sobrevivência (%)	98,0	96,0	96,0	94,0	100,0	95,0	91,0	93,0
Ocorrência de ecdises (No.)	13	20	16	5,67	5	2	6	0
Peso médio final (g)	6,00	5,75	5,84	6,00	6,84	6,73	6,96	6,71

* Valores médios dos tanques-controle: C₁, C₂ e C₃.

4.1. Análises

A curva de calibração apresentou alto grau de linearidade ($r^2=1,0$), demonstrando elevada correlação entre a concentração das soluções injetadas no aparelho cromatográfico e a área de pico formada. Desta forma, a área do pico tem relação direta com a concentração do composto analisado.

Os limites de detecção e quantificação estimados para a metodologia adotada foram $0,0573$ e $0,1552 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente, quando injetados $100 \mu\text{L}$ de solução no equipamento de cromatografia líquida.

Após análise dos resultados, o índice de recuperação da oxitetraciclina na amostra, estabelecido para a técnica de extração empregada, foi $81,68\%$ ($\text{SD}\pm 1,54$).

O tempo de retenção de $4,5$ minutos, revelado pela solução-padrão injetada, permitiu identificar o pico formado pela oxitetraciclina contida na amostra. A Figura 4 representa os picos da oxitetraciclina.

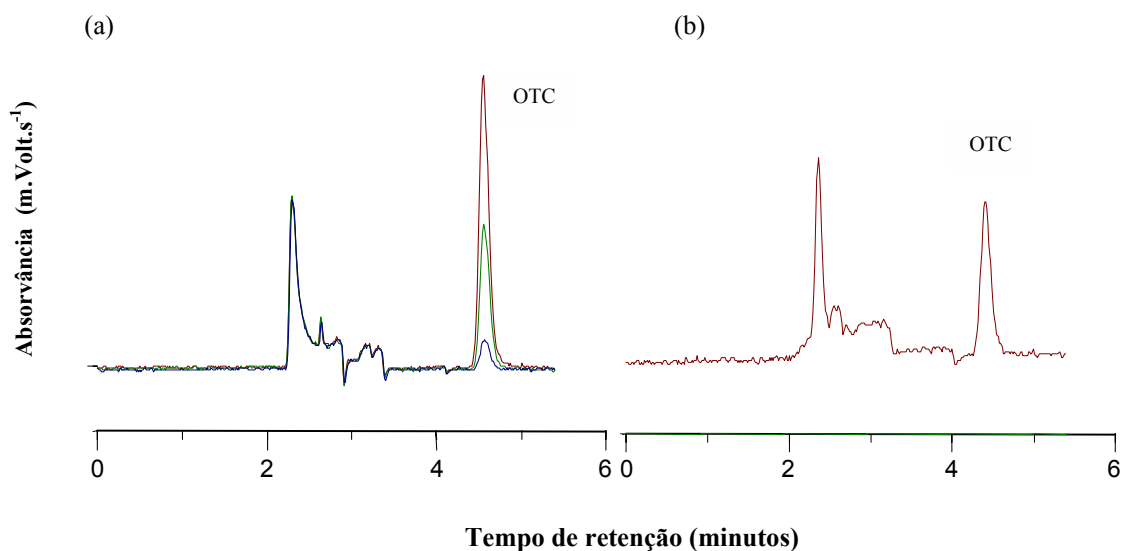


Figura 4. Cromatograma típico mostrando os picos da OTC (volume injetado $100\mu\text{L}$; tempo de retenção $4,5$ minutos): (a) injeções das soluções-padrão empregadas na construção da curva de calibração; (b) injeção de solução de extração de tecido muscular de *L. vannamei*.

4.2. Parâmetros Físico-Químicos

Os parâmetros físico-químicos, monitorados durante as investigações em laboratório e campo, apresentaram valores dentro dos padrões aceitáveis pela espécie estudada (Tabela III). A temperatura média registrada nos tanques foi $26,8 \pm 0,31^\circ\text{C}$, próxima àquela observada em campo, de $26,5 \pm 0,52^\circ\text{C}$ durante a manhã (04:30h) e $29,9 \pm 0,26^\circ\text{C}$ à tarde (15:00h). Na bateria de tanques-tratamento e controle, a salinidade média observada foi 34,4 e 33,9‰ respectivamente. Por outro lado, a estação quente no período da investigação, promoveu concentrações salinas mais elevadas no viveiro, onde estavam instaladas as gaiolas, quando a salinidade média atingiu 43‰; portanto, bem superior àquela registrada em laboratório.

Os níveis de oxigênio dissolvido mantiveram-se relativamente estáveis, com médias de $5,90 \pm 0,38 \text{mg.L}^{-1}$ nos tanques-tratamento e $5,95 \pm 0,43 \text{mg.L}^{-1}$ na bateria de tanques-controle, alcançando os limites mínimos de 5,21 e 5,07 mg.L^{-1} , respectivamente. No ambiente do viveiro, entretanto, ocorreu uma nítida variação diária nos níveis de oxigênio dissolvido, que foram em média, $3,1 \pm 0,44 \text{mg.L}^{-1}$ pela manhã e $10,2 \pm 2,11 \text{mg.L}^{-1}$ à tarde.

Nos tanques-tratamento e controle, o pH médio foi $7,75 \pm 0,07$ e $7,72 \pm 0,07$, quando os valores máximos e mínimos foram 7,57 até 7,89 e 7,57 até 7,86, respectivamente. Em campo, por sua vez, o pH foi mais alto, alcançando 8,3.

Quanto aos índices de compostos nitrogenados, amônia livre e ionizada, observaram-se concentrações inferiores na bateria de tanques em laboratório em comparação à registrada no viveiro, verificando-se níveis médios de $0,0233 \pm 0,0131$ e $0,7147 \pm 0,3409 \text{mg.L}^{-1}$ na bateria-tratamento, $0,0273 \pm 0,0116$ e $0,7910 \pm 0,3585 \text{mg.L}^{-1}$ na bateria-controle e $0,2564 \pm 0,3170$ e $2,1478 \pm 0,3179 \text{mg.L}^{-1}$ no viveiro, respectivamente. Quanto às concentrações de nitrito, ocorreu comportamento inverso, sendo inferiores no viveiro, $0,0022 \pm 0,0008 \text{mg.L}^{-1}$, comparado ao resultado médio registrado nos tanques tratamento ($0,0197 \pm 0,0055 \text{mg.L}^{-1}$) e controle ($0,0202 \pm 0,0060 \text{mg.L}^{-1}$).

A intensidade de luz natural e fluorescente incidentes sobre a superfície da água em ambos os ambientes experimentais – em laboratório com a utilização de tanques e campo empregando gaiolas - apresentaram valores bastante diferentes. Coletados em quatro pontos distintos do viveiro, registraram-se $113.640 \pm 40.961 \text{Lux}$, em média; comparados a $326 \pm 31,9 \text{Lux}$ no tratamento em laboratório. No entanto, em laboratório a água apresentou elevada

transparência durante a investigação, ao contrário daquela observada no viveiro, que atingiu a média de 24,3 cm empregando o Disco de Sechii.

Tabela III. Parâmetros físico-químicos da água, monitorados durante a investigação em laboratório e sob condições seminaturais em viveiro de cultivo.

Parâmetro	Tratamento Tanque		Controle Tanque		Viveiro	
	Média ± DP	m / M	Média ± DP	m / M	Média ± DP	m / M *
Temperatura (°C)	26,8±0,31	26,0-32,0	26,8±0,32	26,0-27,3	26,5±0,52 * 29,9±0,26 **	26,0-27,0 29,0-30,0
Luminosidade (Lux)	326,0±31,9	270,0-374,0	307,8±34,4	247,0-384,0	113.640±40961	17.050-138.700
Salinidade (‰)	34,4±0,4	34,0-35,0	33,9±0,3	33,3-34,3	43,5	43,0-44,0
Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)	5,90±0,38	5,21-6,63	5,95±0,43	5,07-6,91	3,10±0,44 * 10,20±2,11 **	2,20-3,70 3,50-12,40
pH	7,75±0,07	7,57-7,89	7,72±0,07	7,57-7,86	8,30±0,14	8,20-8,40
Nitrito (mg.L ⁻¹)	0,0197±0,0055	0,0144-0,0270	0,0202±0,0060	0,0140-0,0300	0,0022±0,0008	0,0010-0,0030
Amônia livre (mg.L ⁻¹)	0,0233±0,0131	0,0020-0,0330	0,0273±0,0116	0,0050-0,0370	0,2564±0,3170	0,2065-0,2800
Amônia ionizada(mg.L ⁻¹)	0,7147±0,3409	0,0370-0,9690	0,7910±0,3585	0,1250-1,1330	2,1478±0,3179	1,7760-2,5950

m / M – valores mínimos e máximos observados

(*) – observação às 04:30 horas

(**) – observação às 15:00 horas

4.3. Residualidade

4.3.1. Tratamento sob Condições de Laboratório

No primeiro dia de tratamento, quando decorridos apenas doze horas de medicação, os animais haviam consumido ração contendo 0,02652 mg (T₁), 0,02464 mg (T₂) e 0,0248 mg (T₃) de oxitetraciclina administrada. Após duas horas, quando realizadas as coletas iniciais, as amostras de tecido abdominal examinadas haviam acumulado 3,059 µg.g⁻¹, 3,382 µg.g⁻¹ e 5,089 µg OTC.g⁻¹ de tecido, nos tanques T₁, T₂, e T₃, respectivamente. A acumulação do composto no músculo progrediu de forma acentuada até atingir as

concentrações máximas de $20,38 \mu\text{g.g}^{-1}$ em T₁ no sétimo dia, $18,81 \mu\text{g.g}^{-1}$ em T₂ no terceiro dia e $14,44 \mu\text{g.g}^{-1}$ no tanque T₃, no sétimo dia de tratamento (Figura 5).

Calculando-se a média das concentrações dos três tratamentos, verifica-se o pico máximo no sétimo dia, quando os níveis de oxitetraciclina nos tecidos analisados alcançaram $17,21 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Figura 6).

Verifica-se na Figura 5 que os desvios entre os tratamentos foram maiores em concentrações mais elevadas do fármaco no tecido animal, comportando-se inversamente, nas menores concentrações. Mesmo submetidos às mesmas condições de tratamento, ou seja, densidade de estocagem, condições de estresse e alimentação, vê-se certa uniformidade na concentração da oxitetraciclina nos animais estocados em T₃, cuja relação comportou-se de forma menos homogênea com os indivíduos povoados nos demais tanques.

Mesmo consumindo oxitetraciclina adicionada à ração, conforme se verifica na Figura 6, houve declínio da concentração no tecido em torno do 7^o. até o 14^o. dia, final do tratamento com o antibiótico. Exceção ocorreu com os camarões estocados em T₁, que apresentaram um pico de $15,36 \mu\text{g.g}^{-1}$ no último dia de medicação, valor distante das $9,95 \mu\text{g.g}^{-1}$ observadas em T₂ e $9,65 \mu\text{g.g}^{-1}$ em T₃. Concluído o tratamento em 14 dias, a concentração média do fármaco observada nos animais acondicionados na bateria tratamento foi $11,66 \mu\text{g.g}^{-1}$.

Vinte e quatro horas de pós-tratamento foram suficientes para as concentrações reduzirem bruscamente, atingindo $9,47 \mu\text{g.g}^{-1}$ (T₁), $4,74 \mu\text{g.g}^{-1}$ (T₂) e $3,69 \mu\text{g.g}^{-1}$ (T₃). Os níveis de $3,77 \mu\text{g.g}^{-1}$ (T₁), $3,76 \mu\text{g.g}^{-1}$ (T₂) e $4,16 \mu\text{g.g}^{-1}$ (T₃), foram observados 48 horas após a última medicação. No pós-tratamento, após decorridas 96 horas (4 dias), a concentração de oxitetraciclina decresceu muito lentamente.

Passados dezessete dias de desassimilação e eliminação do fármaco, consequência da atividade metabólica dos animais medicados, foram observados índices de residualidade nas concentrações de $0,148 \mu\text{g.g}^{-1}$ (T₁), $0,142 \mu\text{g.g}^{-1}$ (T₂) e $0,198 \mu\text{g.g}^{-1}$ (T₃).

A totalidade do antibiótico consumido diariamente pelos camarões povoados na bateria de tanques-tratamento está representada na Figura 7.

O desenvolvimento do modelo matemático representativo da relação “concentração” vs. “tempo”, nos dois ambientes experimentais, permitiu estimar o tempo de residência-T_R da oxitetraciclina, até o nível considerado como “branco” ($0,015 \mu\text{g.g}^{-1}$), encontrado nas

amostras-controle em razão de “ruído”, próprio do equipamento cromatográfico. Ao lançar o valor mencionado no modelo matemático, obteve-se o T_R estimado para a oxitetraciclina em laboratório por 25 dias.

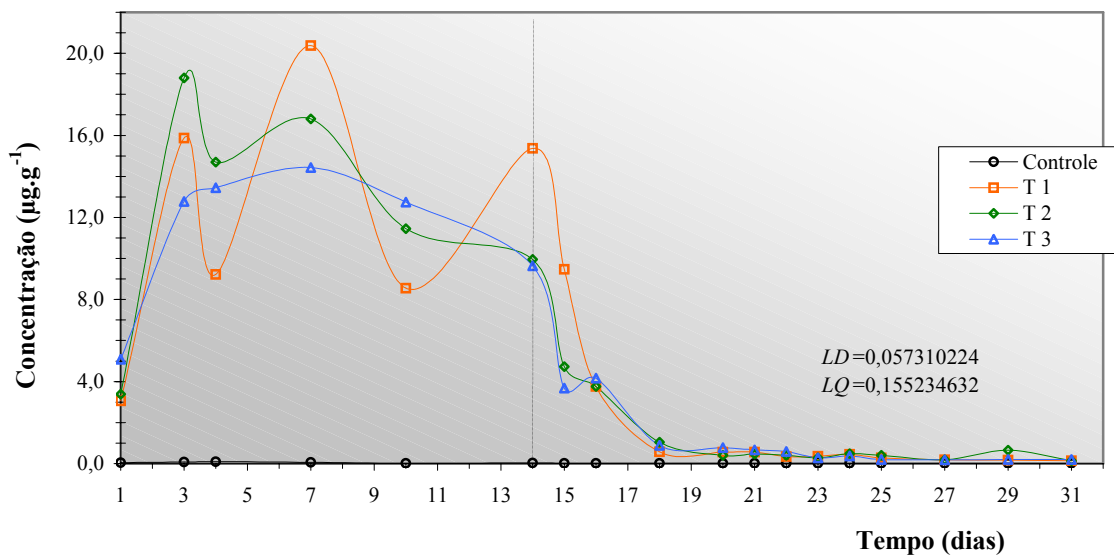


Figura 5. Concentração do antibiótico oxitetraciclina detectada no tecido abdominal de *L. vannamei*, durante e após tratamento com o fármaco na dosagem de $4g.kg^{-1}$ de ração, durante 14 dias, empregando ração medicada em camarões estocados em tanques.

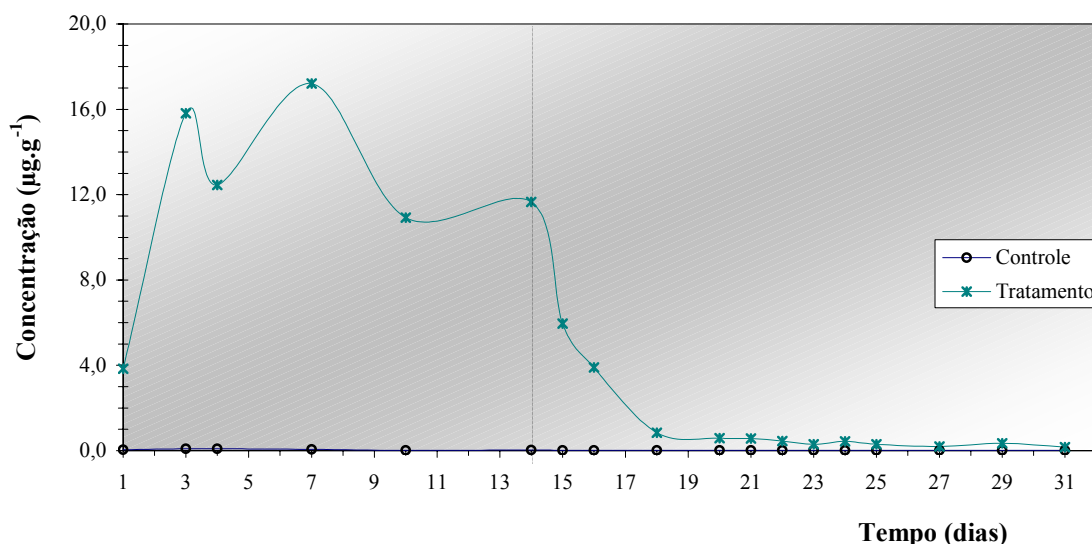


Figura 6. Concentração média do antibiótico oxitetraciclina detectada no tecido abdominal de *L. vannamei*, durante e após tratamento com o fármaco na dosagem de $4g.kg^{-1}$ de ração, por 14 dias, empregando ração medicada em camarões estocados em tanques.

4.3.2. Tratamento sob Condições Naturais

Camarões que receberam tratamento em condições naturais de viveiro, sujeitos às variações ambientais, manifestaram comportamento e níveis antibióticos diferenciados daqueles observados em laboratório.

Pela diferença da ração oferecida daquela não consumida, pôde-se quantificar o consumo acumulado diário de antibiótico, que demonstrou ser 17,61% inferior no tratamento em gaiolas instaladas no viveiro, em relação ao consumo acumulado no tratamento em tanques. A Figura 7 representa o consumo acumulado diário de oxitetraciclina pelos camarões estocados em ambos os ambientes experimentais, bem como a diferença, em valores absolutos, entre eles.

Passadas doze horas após a primeira medicação, animais estocados nas gaiolas G₁, G₂ e G₃ apresentaram 2,057 $\mu\text{g.g}^{-1}$, 0,239 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e 1,631 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de concentração de OTC no tecido, respectivamente. Problemas com o arraçoamento ocorrido com os indivíduos da gaiola G₂, identificado apenas no 11^o. dia de tratamento, provocaram alterações, durante este período, na concentração do fármaco no tecido desses animais. Camarões investigados nas gaiolas G₁ e G₃, segundo a Figura 8, apresentaram comportamento decrescente na concentração, mesmo com a manutenção da medicação, nos primeiros três dias de tratamento, surgindo então novo pico de crescimento.

Até o décimo segundo dia verifica-se o acúmulo gradativo da oxitetraciclina no tecido abdominal, apesar da ocorrência de picos de acumulação (Figura 9). As concentrações máximas foram registradas no 12^o. dia de tratamento, quando se observaram níveis de até 3,54 $\mu\text{g.g}^{-1}$, 2,576 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e 5,221 $\mu\text{g.g}^{-1}$ em animais tratados nas gaiolas G₁, G₂ e G₃, respectivamente, sendo a média 3,779 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Finalizado o tratamento, os níveis antibióticos no tecido foram inferiores àqueles registrados em camarões com apenas três dias de medicação. Quarenta e oito horas de pós-tratamento foram suficientes para a concentração média decrescer de 2,142 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para 0,434 μg de oxitetraciclina por grama de tecido animal. No primeiro e segundo dias, os índices de residualidade reduziram 53,87% e 79,73%, respectivamente; por sua vez, em laboratório, a concentração reduziu 48,86% (1^o. dia) e 66,57% (2^o. dia) (Figura 10).

Nesta fase, ao alcançarem valores médios de $0,5 \mu\text{g.g}^{-1}$, observa-se um declínio gradual e lento da concentração no tecido. Comportamento semelhante ocorreu com exemplares investigados, sob condições de laboratório.

Aplicando o modelo matemático representativo da relação “concentração” vs. “tempo” em campo, estimou--se o T_R em 23 dias, ou seja, quando a concentração das amostras de camarões medicados atingiu quantidades semelhantes àquele do controle, de $0,031 \mu\text{g.g}^{-1}$ (branco), em razão de “ruído”, próprio do equipamento cromatográfico.

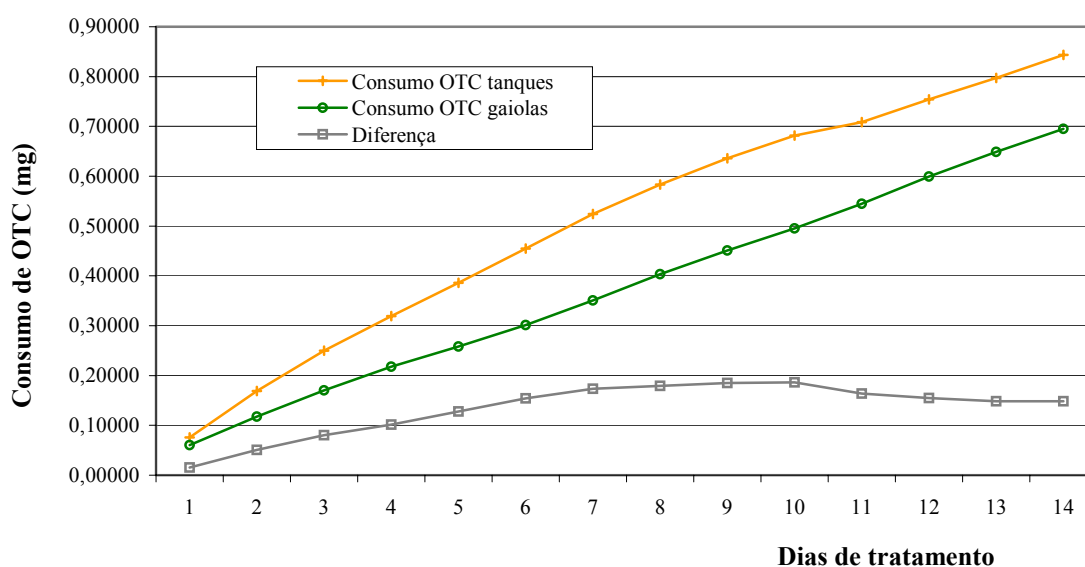


Figura 7. Consumo acumulado diário de oxitetraciclina por camarões *L. vannamei* estocados sob condições de laboratório e viveiro, recebendo dosagem de 4g OTC.kg^{-1} ração, durante um período de 14 dias.

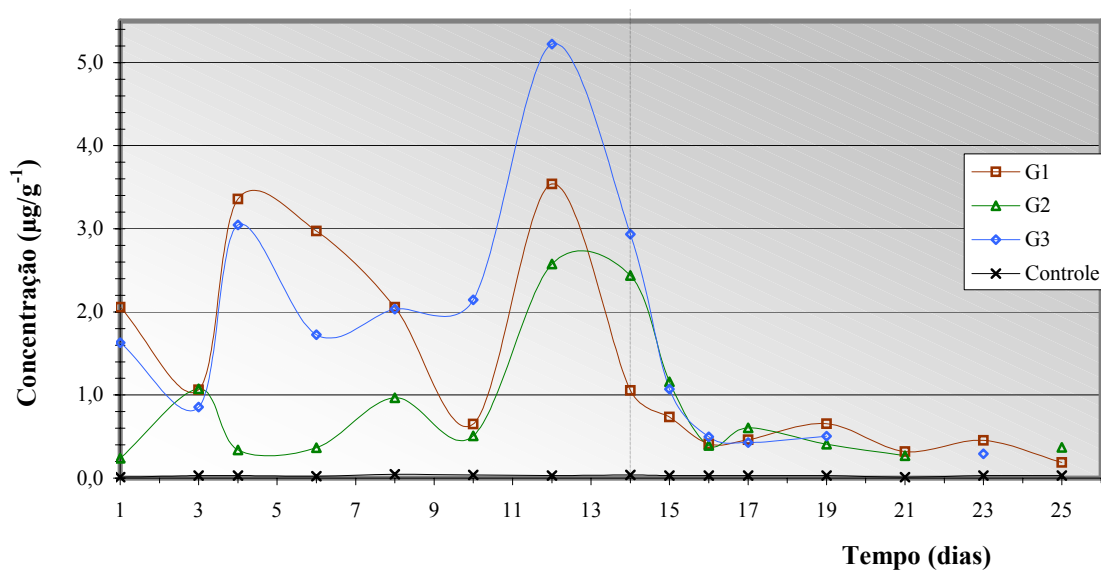


Figura 8. Concentração do antibiótico oxitetraciclina no tecido abdominal de *L. vannamei*, durante e após tratamento com o fármaco na dosagem de 4g.kg^{-1} de ração, durante 14 dias, empregando ração medicada em camarões estocados sob condições de viveiro.

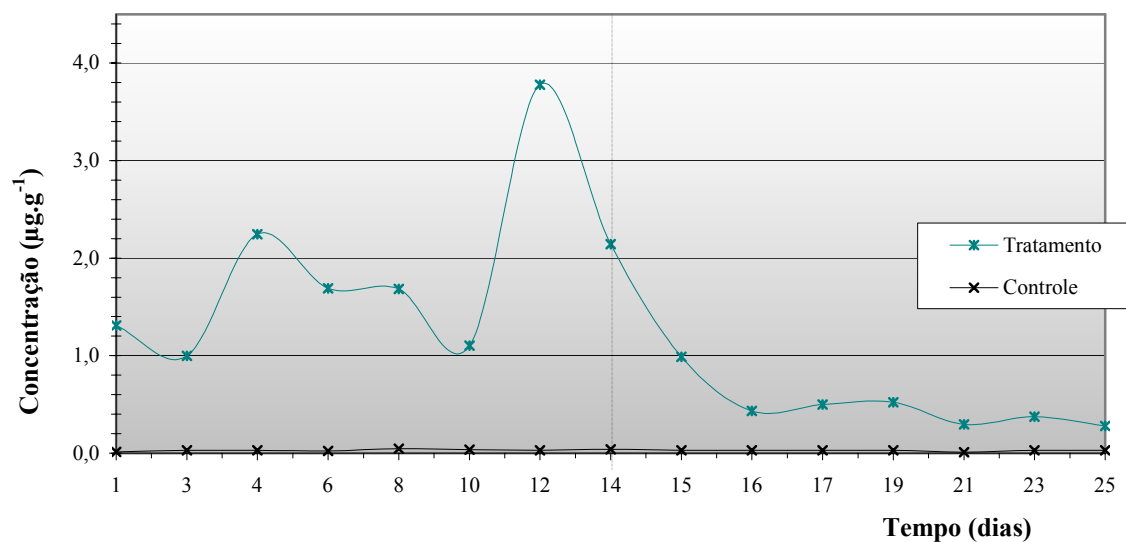


Figura 9. Concentração média da oxitetraciclina no tecido abdominal de *L. vannamei*, durante e após tratamento com o fármaco na dosagem de 4g.kg^{-1} de ração, durante 14 dias, empregando ração medicada em camarões estocados sob condições de viveiro.

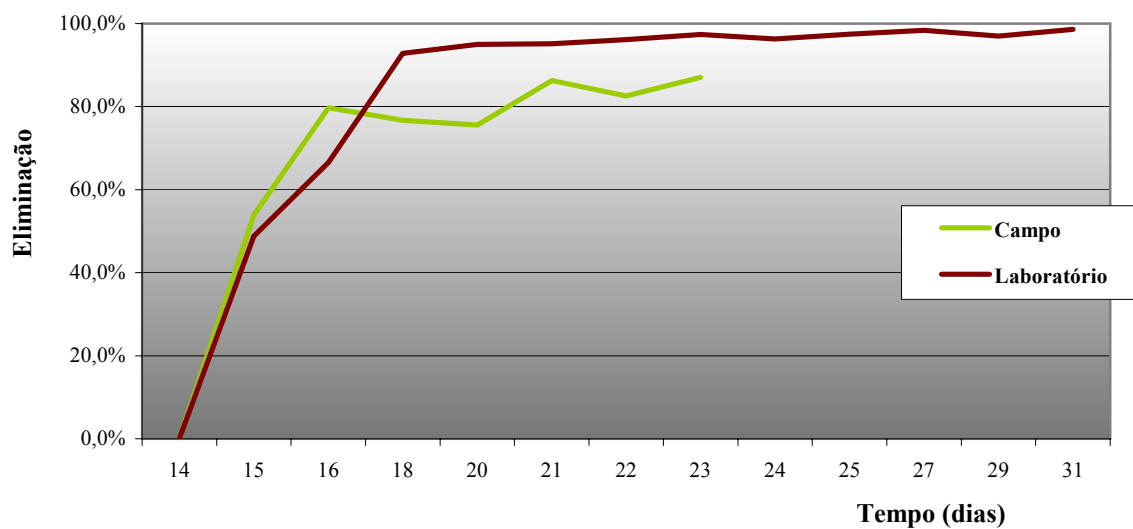


Figura 10. Velocidade de eliminação da oxitetraciclina no período de pós-tratamento, em termos percentuais, por camarões *L. vannamei* medicados nos ambientes experimentais de campo e laboratório.

5. DISCUSSÃO

A sobrevivência em ambos os ambientes experimentais foi satisfatória. As mortes registradas resultaram principalmente do escape dos animais dos tanques ou gaiolas durante o manejo, ou à noite. O comportamento vigoroso e saudável dos camarões durante o manuseio, bem como o crescimento em peso (Tabela II), indicaram que a dieta ofertada atendeu a manutenção das atividades normais.

A adição do antibiótico à ração parece não ter influenciado a palatabilidade. Mohny *et al.* (1997) registraram uma sensível redução no consumo de dieta medicada ($P=0,007$) por camarões *Litopenaeus stylirostris*, quando comparados a indivíduos alimentados somente com ração livre de antibiótico.

Uma vez que, métodos de análise microbiológica detectam exclusivamente antibióticos biologicamente disponíveis (GESAMP, 1997), ou seja, biologicamente ativos, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, empregada neste estudo, possibilitou, também, a obtenção de resultados quantitativos dos níveis de oxitetraciclina biologicamente indisponíveis. As condições analíticas foram satisfatórias, apresentando níveis de recuperação e limite de detecção próximo ao de outros autores, empregando técnica semelhante. Björklund (1991) refere-se à recuperação de $87,6\pm 3,0\%$ e limite de detecção $0,05 \mu\text{g.g}^{-1}$ em análise cromatográfica para oxitetraciclina em tecido animal.

Nas condições em estudo, resíduos de oxitetraciclina foram observados em todos os tratamentos doze horas após a introdução da medicação, quando realizada a primeira análise. Provavelmente, níveis mais baixos seriam registrados em menos horas, uma vez que a velocidade de assimilação e distribuição do fármaco, resultante do metabolismo animal, demonstrou ser elevada. Corliss (1979) somente detectou resíduos de oxitetraciclina em tecido de *Penaeus setiferus*, atualmente classificado como *Litopenaeus setiferus*, 48 horas após o consumo de oxitetraciclina na dosagem de 1g OTC.kg^{-1} e, em 24 horas, após o consumo na dosagem de $5-10\text{g OTC.kg}^{-1}$. Empregando metodologia semelhante, Brillantes *et al.* (2001), detectaram $6,28 \mu\text{g OTC.g}^{-1}$ no tecido abdominal em machos e fêmeas de camarão da Malásia, *Macrobrachium rosenbergii*, 14 horas após o tratamento com ração medicada a $2,5 \text{g.kg}^{-1}$. Por outro lado, através da técnica de administração intravascular única, Reed *et al.* (2004) injetaram $11,1 \mu\text{g OTC.g}^{-1}$ de tecido em camarão da espécie *L. setiferus* e verificaram que a hemolinfa imediatamente atingiu $15 \mu\text{g.ml}^{-1}$, reduzindo a

1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 40 horas após a injeção. Segundo os autores, o comportamento é típico de drogas que apresentam rápida fase de distribuição, acompanhada de vagarosa fase de eliminação.

Durante o período de tratamento pôde-se observar evidentes discrepâncias nas concentrações mais elevadas (Figuras 5 e 8), contudo, obedecendo às mesmas tendências crescente/decrecente no tempo, de modo sistemático. Este comportamento foi detectado em ambas as formas de investigação, campo e laboratório, embora não tenha ocorrido coincidências de pico entre elas. De um modo geral, vários elementos podem contribuir para essas variações. A atividade fisiológica provavelmente responde diferentemente, conforme a concentração do antibiótico no tecido, alterando de alguma maneira a atividade metabólica animal. Deste modo, haveria momentos em que o antibiótico consumido seria principalmente acumulado no organismo e atingido o limite funcional, predominaria a expulsão do fármaco, promovida por mecanismos de excreção. Malvisi *et al.* (1996), entretanto, supõem que o elevado desvio-padrão na concentração de oxitetraciclina por eles observado na dourada europeia, *Sparus aurata*, durante o período de tratamento, deveu-se à considerável variação não-sistêmica no consumo da ração medicada, bem como pela competição acentuada por alimento medicado entre os animais analisados. Isto corrobora o pensamento de Brillantes *et al* (2001), ao investigar a residualidade do antibiótico em *M. rosenbergii*. Certamente, prováveis mudanças no consumo de ração medicada afetam, sobremaneira, os níveis de acumulação do antibiótico no tecido. Contudo, este fenômeno não foi observado entre os camarões empregados no presente trabalho, pois a densidade de estocagem satisfatória, tamanho homogêneo dos camarões empregados, bem como a oferta de alimento medicado em abundância, reduziram esse fator. Uma vez que diferenças no tamanho, idade e condição fisiológica de cada camarão podem produzir grandes variações na concentração do fármaco na hemolinfa em *L. setiferus* (Reed *et al.*, 2004), o desenho experimental e a técnica de amostragem adotados em campo e laboratório neste estudo, permitiram minimizar significativamente tais variações.

Ao examinar os valores expressos nas Figuras 6 e 9, percebe-se nítida diferença de concentração no tecido animal entre ambos os modelos. Em campo, a concentração média durante o tratamento, 1,87 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, foi bem inferior àquela registrada em laboratório de 11,98 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, ou seja, 6,4 vezes maior. Apesar do tratamento e da técnica de amostragem semelhantes, em laboratório adotou-se o sistema de circulação fechada, onde toda a oxitetraciclina lixiviada manteve-se no mesmo meio onde se encontravam os camarões. Enquanto em campo, as gaiolas instaladas no viveiro com área 7,5 hectares e coluna d'água

em média 1,2 m, ocorria maior diluição do antibiótico lixiviado da ração medicada, conseqüentemente não assimilada por outras vias; além de outros fatores como renovação de água e interações ambientais, que são bem mais intensas em condições seminaturais.

São pouco conhecidas e insuficientes as informações que comprovam a absorção de antibióticos por outras vias, senão a oral, por camarões peneídeos. Porém, indivíduos estocados em um tanque, por onde circulava a mesma água da bateria de tanques-tratamento e alimentados somente com a ração controle (sem antibiótico), apresentaram valores residuais de oxitetraciclina (de 0,12 a 0,51 $\mu\text{g.g}^{-1}$). Bebak-Williams *et al.* (2002), ao distribuírem dieta medicada para peixes em um sistema com recirculação de água doce, detectaram resíduos de oxitetraciclina no tecido dos animais, na água e sedimentos do filtro.

Björkland *et al.* (1991), Kerry *et al.* (1995), Campbell *et al.* (2001) e Tendência & De La Peña (2001) sugerem que os antibióticos detectados em organismos da população nativa e sedimentos, próximos a unidades de cultivo, originam-se principalmente: da ração medicada não consumida; do antibiótico lixiviado no meio aquático antes do consumo pelos organismos tratados; dos excrementos e metabólitos naturais dos organismos cultivados e medicados. Na interfase entre cultivos, estes resíduos seriam transportados aos ambientes naturais. Portanto, pode-se sugerir que os altos níveis de antibiótico encontrado nos camarões estocados em laboratório, diferentemente daqueles povoados no viveiro, deve-se ao acúmulo do fármaco diluído no meio aquático e sua absorção através de outros processos, que não a via oral, como por exemplo, através das brânquias, onde a água circula constantemente. Na Noruega, onde a oxitetraciclina é aplicada na forma de ração em peletes medicados, estatísticas têm demonstrado que somente 20-30% do antibiótico oferecido é realmente absorvido pelos peixes, enquanto o resto, 70-80%, alcança os ambientes naturais (Samuelsen, 1989).

Outro fator a ser analisado é a quantidade de antibiótico consumido diariamente pelos camarões investigados (Figura 7). Observa-se a diferença da ração medicada consumida no sistema montado em laboratório, que foi 17,61% superior ao consumo em campo. Explicável pela disponibilidade de alimento natural no viveiro, além da ração medicada ofertada; ao passo que, no laboratório, o alimento disponível era unicamente a ração medicada, resultando em maior consumo. Uma vez que o aumento no consumo reflete na concentração residual no tecido animal (Bermúdez-Almada, 1999; Montoya &

Reyes, 2002), mas provavelmente de forma não proporcional, isto justificaria o elevado nível antibiótico nos camarões tratados em condições controladas laboratoriais.

Segundo Reed *et al.* (2004), fatores ambientais podem afetar a fisiologia e a eliminação da droga. Níveis relativamente estáveis dos fatores físico-químicos tais como temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, amônia e nitrito e pH, observados durante a atual pesquisa, reduziram prováveis causas de estresse.

A degradação de oxitetraciclina em água marinha é influenciada pela intensidade da luz e temperatura (Samuelson, 1989). Apesar de muito superior àquela observada em laboratório, a incidência de luz em campo (Tabela III) provavelmente não contribuiu para a degradação, pois a transparência reduzida da água em consequência da produtividade primária do viveiro - em média 24,3 cm (Disco de Sechii), minimizou seus efeitos.

Em viveiro, onde a atividade fitoplanctônica exerce função primordial na produção de oxigênio e gás carbônico, observou-se uma nítida variação diária nos níveis de oxigênio dissolvido. Outros fatores abióticos possivelmente influenciaram, direta ou indiretamente, para a redução ou estabilidade do composto. Por isto, é relevante ressaltar a importância da interação de fatores, existentes no ambiente de viveiro, mas ausentes no modelo em laboratório.

Os baixos níveis da concentração antibiótica registrada em campo, além dos fatores já mencionados, podem ainda estar associados à salinidade da água do viveiro que foi 26,5% superior àquela observada em laboratório (Tabela III). Montoya & Reyes (2002) realizaram testes para avaliar a porcentagem de oxitetraciclina lixiviada em dietas medicadas nas dosagens 1,0, 5,0 e 10,0 g.kg⁻¹, empregando dois tipos de água: doce e salgada. Os autores concluíram que a lixiviação nestas dietas foi influenciada significativamente pela salinidade, sendo que, as perdas médias foram: 6,5% e 12,5% em água doce e 13,5% e 28% em água salina, nos primeiros 30 minutos e 2 horas de exposição, respectivamente. Lunestad & Goksoyr (1990) demonstraram que concentrações de Mg⁺⁺ e Ca⁺⁺ em água salina reduzem de forma marcante a atividade da oxitetraciclina neste meio. Por outro lado, o sedimento exerce efeito inibitório mais intenso nas oscilações do antibiótico do que as concentrações de cátions divalentes presentes em água salina (Smith, 1996). Vale salientar que, embora a persistência de oxitetraciclina em águas salinas seja mitigada pela formação de novos complexos, a droga também é administrada em cultivos de água doce, onde uma maior

fração do composto deve existir na forma livre, podendo surtir efeitos adversos sobre a atividade antimicrobiana do ambiente (Capone *et al.*, 1996).

Até o terceiro dia de tratamento (Figura 6), percebe-se a tendência de aumento na concentração do antibiótico nos animais investigados em laboratório, observando-se o oposto em campo (Figura 9). Em ambos, porém, ocorreu uma tendência crescente até atingir o pico residual. O comportamento das concentrações observadas corresponde ao modelo descrito por Gillies *et al.* (1991), no qual a curva de concentração da droga vs. tempo apresenta uma fase ascendente, resultante principalmente de sua absorção, e uma fase posterior, descendente, revelando principalmente a eliminação.

A concentração máxima de $3,78 \mu\text{g.g}^{-1}$, registrada em campo no dia 12^o. de tratamento, demonstrou ser bastante inferior àquela detectada no 7^o. dia em laboratório ($17,21 \mu\text{g.g}^{-1}$). Estas concentrações de oxitetraciclina são as maiores já observadas em tecido abdominal de peneídeos. Os valores são superiores aos registrados por Montoya & Reyes (2002), de $12,20 \mu\text{g.g}^{-1}$, utilizando a espécie *L. vannamei* medicada com dosagem $4,47 \text{g OTC.kg}^{-1}$ de ração, por 14 dias em tanques. Brillantes *et al.* (2001) registraram $19,93 \mu\text{g.g}^{-1}$ no cefalotórax e $10,91 \mu\text{g.g}^{-1}$ no tecido muscular de machos de *M. rosenbergii* quando medicados com $5,0 \text{g OTC.kg}^{-1}$ de ração, após 7 dias de medicação. Corliss (1979) detectou $4,25 \mu\text{g.g}^{-1}$ em juvenis de *L. setiferus* após tratamento com ração contendo $5,0 \text{g OTC.kg}^{-1}$ de ração, no 7^o. dia de medicação, empregando o método de difusão microbiológica nas suas análises, enquanto que Mohny *et al.* (1997), aplicando a mesma metodologia de análise, observaram picos entre $4,85\text{-}5,67 \mu\text{g.g}^{-1}$ em *L. stylirostris* medicados a $1,5 \text{g OTC.kg}^{-1}$ de ração.

Torna-se extremamente difícil comparar os resultados observados com estudos realizados por outros autores, uma vez que uma combinação de fatores pode interferir nos resultados. A forma de preparação do alimento, assim como a qualidade da água empregada nos ensaios pode alterar a disponibilidade da oxitetraciclina (Brillantes *et al.*, 2001), além disso, a técnica de cromatografia líquida, que é reconhecidamente mais exata, apresenta melhores limites de detecção (Ueno *et al.*, 1999; Moretti *et al.*, 1994). Novos métodos de determinação têm sido adotados a cada ano e diferenças de metodologias entre laboratórios podem dificultar verdadeiras comparações de resultados (Schnick, 2001). Vale ressaltar que, principalmente os modelos de tratamento e as doses terapêuticas associadas à via de administração utilizadas promoverão estas discrepâncias. Porém, os modelos empregados,

desde que satisfeitos os preceitos fundamentais e caracterizadas as condições da pesquisa, produzirão dados significativamente importantes.

Os picos máximos médios de $11,66 \mu\text{g g}^{-1}$ (variação de $9,65 - 15,36 \mu\text{g g}^{-1}$) atingido em laboratório no 7º. dia e de $2,14 \mu\text{g g}^{-1}$ (variação de $1,06 - 2,93 \mu\text{g g}^{-1}$) verificado no 12º. dia em campo, refletem os padrões de concentração diferenciados conforme as condições ambientais onde se realiza a investigação.

Em campo, o valor máximo da curva de concentração ocorreu próximo do final do tratamento antibiótico. Ou seja, indivíduos povoados em viveiro, cuja acumulação da oxitetraciclina demonstrou ser mais reduzida, apresentaram uma fase de distribuição do composto no tecido bem mais extensa do que a fase de eliminação, que foi relativamente curta. Comportamento inverso ocorreu com os indivíduos investigados em laboratório, com altas concentrações no tecido, quando apresentaram uma fase de distribuição curta e uma longa fase de eliminação. O evento provavelmente está relacionado aos níveis de tolerabilidade desses crustáceos ao composto examinado, motivando-o à ativação de mecanismos de eliminação. Segundo Gillies *et al.* (1991), de um modo geral, fases de eliminação são mais lentas e caracteriza-se pela homogeneidade cinética entre os níveis da droga em todos os líquidos e tecidos dos organismos. Isto sugere que, para a obtenção da homogeneidade cinética, parte da energia destinada ao crescimento, ou realização das funções vitais, seja despendida para a eliminação do composto. Ou ainda, podem ser ativados mecanismos redutores de absorção, promovendo a eliminação direta do composto através do sistema digestório, logo que a dieta medicada seja consumida.

O desvio das concentrações, observado na Figura 5, possibilita avaliar a discrepância no momento da distribuição (acúmulo nos tecidos) durante o tratamento, bem como o comportamento mais homogêneo no pós-tratamento, fase exclusiva de expulsão da droga.

Empregando métodos de análise microbiológica e química, Bermúdez-Almada *et al.* (1999) registraram pico máximo de $1,82 \mu\text{g g}^{-1}$ em *P. vannamei* adultos, três semanas após o início da medicação quando administrado $500 \text{ mg OTC.kg}^{-1}$. Por sua vez, Montoya & Reyes (2002) referem que as maiores concentrações alcançadas para a mesma espécie ocorreu aproximadamente no sétimo dia, quando medicados em média com $4,47 \text{ g OTC.kg}^{-1}$. Segundo os autores, os dias de tratamento restantes serviram para manter a concentração do antibiótico no organismo. Ao administrar oxitetraciclina oralmente em enguias japonesas, *Anguilla japonica*, em dose única (50 mg.kg^{-1} de peso corporal), utilizando um cateter, Ueno

et al. (2003) obtiveram a concentração máxima ($0,77 \mu\text{g.mL}^{-1}$) no sangue no 1º. dia e após 20 dias foram detectados valores inferiores a $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Quando administrada intravascularmente, a concentração alcançou $380 \mu\text{g.mL}^{-1}$ imediatamente após a aplicação, decrescendo gradualmente para $4,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em dezessete dias.

No último dia de tratamento do presente estudo, os níveis antibióticos de $11,66 \mu\text{g.g}^{-1}$ nos camarões em laboratório foram inferiores àqueles registrados no tecido de indivíduos no terceiro dia de medicação. É provável que o comportamento esteja associado à intolerância desses organismos às altas concentrações do antibiótico no tecido, no qual o processo de eliminação deve tornar-se preponderante para manutenção das funções vitais.

Finalizado o tratamento, as concentrações no tecido muscular reduziram muito rapidamente nos dois ambientes experimentais; no entanto, de forma mais acentuada em campo até o 3º. a 4º. dias. Decorrido este prazo, a velocidade de eliminação da oxitetraciclina em indivíduos sob condições de laboratório pareceu ser mais acentuada (Figura 10). Segundo Montoya & Reyes (2002), o comportamento acumulativo da oxitetraciclina em camarões da espécie examinada não é dependente da dosagem administrada; da mesma forma, a velocidade de eliminação não tem relação com os níveis de oxitetraciclina acumulada durante o tratamento.

Atingidos os níveis inferiores a $0,84 \mu\text{g.g}^{-1}$ no 4º. dia de pós-tratamento em laboratório e $0,43 \mu\text{g.g}^{-1}$ no 2º. dia em campo, a residualidade da oxitetraciclina no tecido animal decresceu de forma lenta.

Chanratchakool *et al.* (1991), referem-se à dose terapêutica, recomendando entre 3-5 g OTC adicionado em 1 kg de ração para combater *Vibrio* no camarão *P. monodon*, comumente conhecido como tigre asiático. Bermúdez *et al.* (2002), por sua vez, recomendam empregar, geralmente, pelo menos quatro vezes a concentração inibitória mínima para atingir doses terapêuticas em *P. vannamei*. Os níveis de oxitetraciclina no tecido abdominal, observados neste estudo durante o estágio de tratamento, mantiveram-se entre os limites da concentração inibitória mínima – CIM citados por Takahashi *et al.* (1985), que recomendam entre $0,10$ a $12,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ contra *Vibrio* sp.

Roque *et al.* (2001) citam que a administração freqüente de oxitetraciclina provavelmente é responsável pela resistência de 43% dos vibrios isolados de camarões no México. No Brasil, Portaria Ministerial no. 193 proíbe a administração de oxitetraciclina sistêmica na alimentação animal (EMBRAPA, 2004). O “Code of Federal Regulations” dos

Estados Unidos (21 CFR 556.500) aprova o uso de oxitetraciclina em salmonídeos, bagres e lagosta nas condições expostas pelo regulamento e estabelece o limite de tolerância de 2,0 ppm em alimentos frescos (FDA, 1998). Com exceção do regime de complacência, o regulamento americano não aprova o uso antibiótico no tratamento de vibrioses em peneídeos. Por outro lado, a “EMEA – European Agency for the Evaluation of Medicinal Products”, responsável pelas regulamentações na Comunidade Econômica Européia - CEE, estabelece o limite máximo de residualidade – LMR de $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ no músculo e leite em todas as espécies produtoras de alimento (EMEA, 1990), inclusive produtos da aquicultura.

Em razão do surgimento freqüente de enfermidades em camarões na aquicultura e manifestações de resistência bacteriana, a administração de antibióticos por meio de rações formuladas precisa ser mais investigada. Propósitos para formulação de doses terapêuticas ótimas minimizariam possíveis impactos sobre os ambientes naturais e a saúde humana.

6. CONCLUSÕES

O limite de tolerância imposta pela Comunidade Européia, observado no 17^o. dia de eliminação (laboratório) e no 16^o. dia (campo) na presente investigação, parece ser plenamente praticável nas unidades de cultivo. Devido à interação de fatores naturais, bióticos e abióticos, assim como das formas de manejo dessas substâncias sobre a acumulação e a residualidade da oxitetraciclina, por segurança, recomenda-se prolongar, por um período maior, o tempo de despesca de animais submetidos à medicação.

O desenvolvimento de modelo matemático apropriado permitiu equacionar a relação “concentração” vs. “tempo”, possibilitando estimar valores além dos limites de detecção e quantificação. Extrapolando os dados, pôde-se determinar o tempo de residência- T_R da oxitetraciclina em campo (23 dias) e laboratório (25 dias). Entretanto, provavelmente períodos distintos seriam necessários para delimitar a residualidade no hepatopâncreas e hemolinfa, onde a oxitetraciclina parece ser mais estável devido à natureza e funcionalidade destes tecidos.

A padronização da técnica de detecção e quantificação de antibióticos em produtos da aqüicultura é de suma importância. Em razão de sua sensibilidade, a CLAE demonstrou ser bastante eficiente, apresentando níveis ínfimos de detecção da oxitetraciclina no tecido dos camarões analisados.

A metodologia obtida nas condições disponíveis mostrou-se adequada para análise residual de oxitetraciclina em tecido de camarões da espécie *L. vannamei*.

O assunto em estudo sugere novas pesquisas para investigar o comportamento destes compostos em animais cultivados destinados ao consumo humano, assim como sua residualidade na água e sedimento das unidades de cultivo, submetendo-os às adversidades ambientais e interferência de fatores físico-químicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC-Associação Brasileira dos Criadores de Camarão. Estatísticas do Setor. *Revista da ABCC*, Recife, ano 5, n. 4, p. 91-92, 2003.

Alderman, D.J.; Rosenthal, H.; Smith, P.; Stewart, J. & Weston, D. Chemicals Used in Mariculture . *ICES Coop. Res. Rep.*, v. 202, 100 p., 1994.

Bebak-Williams, J.; Bullock, G. & Carson, M. C. Oxytetracycline residues in a freshwater recirculating system. *Aquaculture*, v. 265, p. 221-230, 2002.

Benbrook, C. M. Antibiotic Drug Use in United States Aquaculture. Sandpoint, Idaho. Fevereiro 2002. Disponível em
<http://www.iatp.org/fish/library/uploadedFiles/Antibiotic_Drug_Use_in_US_Aquaculture.doc>
Acesso em: 21 abr. 2003.

Bermúdez-Almada, M.C.; Pérez-Tello, M.G.; Valenzuela-Quintanar, A.I. & Vázquez-Moreno, L. Oxytetracycline residues in cultured white shrimp tissue by HPLC and a microbial receptor assay. *Journal of Food Science*, v. 64, n. 4, p. 638-640, 1999.

Björklund, H.V.; Räbergh, C.M.I. & Bylund, G. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*, v. 97, p. 85-96, 1991.

Boscardin-Borghetti, N. R.; Ostrensky, A. & Borghetti, J. R. Aqüicultura: Uma Visão Geral sobre a Produção de Organismos Aquáticos no Brasil e no Mundo. FIEP/CIEP/SESI/SENAI/IEL, Curitiba, 128 p., 2003.

- Boyd, C. E. & Lawrence, M. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquaculture Engineering*, v. 20, p. 113-132, 1999.
- Brillantes, S.; Tanasomwang, V.; Thongrod, S. & Dachanantawitaya, N. Oxytetracycline residues in giant freshwater (*Macrobrachium rosenbergii*). *J. Agric. Food Chem.*, v. 49, p. 4995-4999, 2001.
- Brock, J. A. & Main, K. L. A. Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. Incorporation of medications into Growout Feeds. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, Louisiane, USA, 242 p., 1994.
- Campbell, D.A.; Pantazis, P. & Kelly, M.S. Impact and residence time of oxytetracycline in the sea urchin, *Psammechinus miliaris*, a potential aquaculture species. *Aquaculture*, v. 202, p. 73-87, 2001.
- Capone, D.G.; Weston, D.P.; Miller, V. & Shoemaker C. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture*, v. 145, p. 55-75, 1996.
- Carson, M. C.; Bullock, G. & Bebak-Williams J. Determination of oxytetracycline residues in matrixes from a freshwater recirculating aquaculture system. *Journal of AOAC International*, v. 85, n. 2, p. 341-348, 2002.
- CEFAS-Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science. Antibiotic Use in Aquaculture: Development of Antibiotic Resistace – Potential for Consumer Health Risks. Bangkok, Thailand, 22-26 July. FAO/NACA/WHO, Weymouth, U.K., 46 p., 1997.
- CENAIM-Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas/ESPOL Fundación. El Uso de Drogas En Acuicultura. *Cenaim Informa*, Boletín Informativo, n. 55, 1 p., Ecuador, 2002.

Chanratchakool, P. & Limsuwan, C. Accumulation of oxytetracycline in tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). *Thai Fish. Gaz.*, v. 44, n. 1, p. 31-33, 1991.

Corliss, J.P. Accumulation and depletion of oxytetracycline in juvenile white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Aquaculture*, n. 16, p. 1-6, 1979.

Corliss, J.P.; Lightner, D. & Zein-Eldin, Z.P. Some effects of oral doses of oxytetracycline on growth, survival and disease in *Penaeus aztecus*. *Aquaculture*, n. 11, p. 355-620, 1977.

Cornejo, G. Concentraciones letales de compuestos químicos en camarones juvenis *Litopenaeus vannamei*. Boletín Informativo, *CENAIM-ESPOL Fundación*, n. 50, 2 p., 2002.

Cuenca, C.; Bermúdez, C.; Espinoza, A.; Gómez-Gill, B. & Roque, A. Evaluación de la concentración de oxitetraciclina en tejidos de poslarvas de *Litopenaeus vannamei* utilizando como biocarreadores nauplios de *Artemia franciscana*. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental, México, 3 p., 2002.

EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Antibióticos no Brasil. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc106/05antibioticos.html>>. Acesso em: 12 abr. 2004.

EMEA-European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Unofficial Consolidated Version of the Annexos I to IV Council Regulations ECC No. 2377/1990. EMEA/EEC. Disponível em <<http://www.emea.eu.int/htms/vet/mrls/mrlfaq.htm>>. Atualizado em 22 set. 2003, acesso em 17 abr. 2004.

FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World's Fisheries and Aquaculture 2002. FAO Information Division. Rome, Italy, 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/sof/sofia/index_en.htm>. Acesso em 13 mar. 2003.

FDA-Food and Drug Administration. Aquaculture Drugs. In *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide*. (Second Edition). FDA: Washington D. C., Chapter 22, 8 p., 1998.

GESAMP-Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection. GESAMP/IMO/FAO/UNESCO-IOC/WHO/IAEA/UN/UNEP. Towards Safe and Effective Use of Chemicals in Coastal Aquaculture. *Rep.Stud. GESAMP*, n. 65, 52 p., 1997.

Gillies, H.C.; Rogers, H.J.; Spector, R.G. & Trounce, J.R.. *Farmacologia Clínica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 559 p., 1991.

Gräslund, S. & Bengtsson, B. Chemicals and biological products used in South-east Asian shrimp farming and their potential impact on the environment – a review. *The Science of the Total Environment*, n. 280, p. 93-131, 2001.

Gräslund, S.; Holmström, K. & Wahlström, A. A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farming. *Marine Pollution Bulletin*, n. 46, p. 81-90, 2002.

Kerry, J.; Hiney, M.; Coyne, R.; NicGabhainn, S.; Gilroy, D.; Cazabon, D. & Smith, P. Fish feed as a source of oxytetracycline-resistant bacteria in the sediments under fish farms. *Aquaculture*, n. 131, p. 101-113, 1995.

Korolkovas, A. & Burckhalter, J.H. *Química Farmacêutica*. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 783 p., 1988.

Lunestad, B. T. & Goksoyr, J. Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. *Dis. Aquat. Org.*, n. 9, p. 67-72, 1990.

Malvisi, J.; Rocca, G.; Anfossi, P. & Giorgetti, G. Tissue distribution and residue depletion of oxytetracycline in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after oral administration. *Aquaculture*, n. 147, p. 159-169, 1996.

MERCK Manual: Diagnóstico e Tratamento. Ed. Roca, São Paulo, 2701 p., 2000.

Mohney, L.L.; Williams, R.R.; Bell, T.A. & Lightner, D.V. The uptake and depletion of oxytetracycline by cultured juvenile blue shrimp, *Penaeus stilirostris* (Crustacea, Decapoda), fed medicated feed for 14 days. *Aquaculture*, n. 149, p. 193-202, 1997.

Montoya, N. & Reyes, E. Acumulación/eliminación de oxitetraciclina en el camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, y su residualidad en dietas artificiales. *El Mundo Acuicola*. v. 8, n. 1, p. 34-37, 2002.

Montoya, N. & Uyaguari, M. Acumulación de antibióticos y su efecto sobre la comunidad bacteriana presentes en sedimentos de piscinas camaroneras. *El Mundo Acuicola*, v. 8, n.2, p. 24, 2003.

Moretti, V. M.; Maggi, G. L.; Albertini, A.; Bellagamba, F.; Luzzana, V.; Serrini, G. & Valfre, F. High-performance liquid chromatographic determination of oxytetracycline in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle tissue. *Analyst*, n. 119, p. 2749-2751, 1994.

Oka, H.; Ikai, Y.; Kawamura, N.; Yamada, M.; Harada, K.I.; Ito, S. & Suzuki, M. Photodecomposition products of tetracycline in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.*, n. 37, p. 226-231, 1989.

Oka, H.; Ito, Y. & Matsumoto, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, n. 882, p. 109-133, 2000.

Onkong, S.; Sermwatanakul, A. & Tantikitti, C. Residues of oxytetracycline in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) reared in cement tank and earthen pond. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, n. 22 (Suppl.), p. 717-724, 2000.

Plataforma Tecnológica do Camarão Marinho Cultivado: Seguimento de Mercado. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Pesca e Aqüicultura – Brasília: MAPA/SARC/DPA, CNPq, ABCC, 276 p., 2001.

Pouliquen, P.; Le Bris, H.; Buchet, V. & Pinault, L. Comparative study on the contamination and decontamination of japanese oyster *Crassostrea gigas* and blue mussel *Mytilus edulis* by oxytetracycline and oxolinic acid. *Marine Ecology Progress Series*, n. 133, p. 143-148, 1996.

Reed, L. A.; Siewicki, T. C. & Shah, J. C. Pharmacokinetics of oxytetracycline in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*. *Aquaculture*, n. 232, p. 11-28, 2004.

Roque, A.; Molina-Aja, A.; Bolán-Mejía, C. & Gomez-Gil, B. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents*, n. 17, p. 383-387, 2001.

Rosenberry, B. World Shrimp Farming. Shrimp News International. San Diego, n. 16, 276 p., 2003.

Samuelsen O.B. Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm. *Aquaculture*, n. 83, p. 7-16, 1989.

Schnick, Rosalie A. Internacional Harmonization of antimicrobial sensitivity determination for aquaculture drugs. *Aquaculture*, n. 196, p. 277-288, 2001.

Smith, P. Is sediment deposition the dominant fate of oxytetracycline used in marine salmonid farms: a review of available evidence. *Aquaculture*, n. 146, p. 157-169, 1996.

Smith, P.; Hiney, M.P. & Samuelsen, O.B. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: A critical evaluation of method and meaning. *Ann. Rev. Fish Dis.*, n. 4, p.273-313, 1994.

Smith, P. & Samuelsen, O.B. Estimates of the significance of out-washing of oxytetracycline from sediments under Atlantic salmon sea-cages. *Aquaculture*, n. 144, p.17-26, 1996.

Spotte, S. Fish and Invertebrate Culture: Water Management in Closed Systems. Wiley-Interscience Publication, New York, 179 p., 1979.

Takahashi, Y.; Itami, T.; Nakagawa, A.; Nishimura, H. & Abe, T. Therapeutic effects of oxytetracycline trial tablets against vibriosis in cultured Kuruma prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, n. 51, p. 1639-1643, 1985.

Tendencia, E.A. & De La Peña, L.D. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture*, n. 195, p. 193-204, 2001.

Tortura, G. J.; Funke, B. R. & Case, C. L. Microbiologia. Ed. Artmed, Porto Alegre, 890 p., 2002.

Ueno, R.; Kinoshita, A. & Wakabayashi, J. Comparative pharmacokinetics of oxytetracycline in eel and its fate in a closed aquatic environment. *Aquaculture*, "article in press", 2003.

Ueno, R.; Sangrungruang, K. & Miyakawa, M. A simplified method for the determination of several fish drugs in edible fish and shrimp by high-performance liquid chromatography, *Food Research International*, n. 32, p. 629-633, 1999.