



**FERNANDO MARCOS RUBIM**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA  
FARMACOCINÉTICA DE FLORFENICOL E NA OXIDAÇÃO  
LIPÍDICA DE FILÉS DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*)**

**LAVRAS-MG  
2021**

**FERNANDO MARCOS RUBIM**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA FARMACOCINÉTICA  
DE FLORFENICOL E NA OXIDAÇÃO LIPÍDICA DE FILÉS DE TILÁPIAS  
(*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Professor Dr. Marcos Ferrante  
Orientador

Professor Dr. Luis David Solis Murgas  
Coorientador

LAVRAS – MG  
2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Rubim, Fernando Marcos.

Avaliação do efeito da temperatura na farmacocinética de  
florfenicol e na oxidação lipídica de filés de tilápias  
(*Oreochromis niloticus*) / Fernando Marcos Rubim. - 2021.  
54 p. : il.

Orientador(a): Marcos Ferrante.

Coorientador(a): Luís David Solis Murgas.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Antibióticos. 2. Farmacologia Veterinária. 3. Produção  
Animal. I. Ferrante, Marcos. II. Murgas, Luís David Solis. III.  
Título.

**FERNANDO MARCOS RUBIM**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA FARMACOCINÉTICA  
DE FLORFENICOL E NA OXIDAÇÃO LIPÍDICA DE FILÉS DE TILÁPIAS  
(*Oreochromis niloticus*).**

**EVALUATION OF THE EFFECT OF TEMPERATURE ON THE  
PHARMACOKINETICS OF FLORFENICOL AND THE LIPID OXIDATION  
OF TILAPIAS FILLETS (*Oreochromis niloticus*).**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Data de Aprovação: 13 de Agosto de 2021

Banca Examinadora:

Dr. Luís David Solis Murgas (FZMV / DMV / UFLA)

Dr.<sup>a</sup>. Daniella Aparecida de Jesus Paula (FZMV / DZO / UFLA)

Dr.<sup>a</sup>. Sheila Rezler Wosiacki (UEM)

Professor Dr. Marcos Ferrante  
Orientador

LAVRAS – MG  
2021

*Dedico este trabalho  
À minha Família, base de todo meu ser*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, e por todas as oportunidades que tive para chegar até aqui. Pelas inúmeras graças, e por Teu amor incondicional de pai, que vela sempre por mim.

Agradeço a minha mãe, Teresa Cristina, e meu pai, José Francisco, que são a base do que sou, pelo exemplo de vida, de amor e companheirismo, que alicerçam nossa família. Por todo suporte e incondicional apoio.

Agradeço aos meus queridos irmãos, Eduardo, Débora e Matheus, que são partes vivas do meu coração. Crescer ao lado de vocês, foi crescer como pessoa, tendo a certeza que sempre tenho a quem recorrer.

Agradeço aos meus queridos avós, presente (Vó Terezinha) e ausentes (Vó Dida, Vó Maria, Vô Berto e Vô Rubim), seus mais simples ensinamentos também foram os mais sábios que carrego comigo. Obrigado por me darem a certeza de que, pelo amor e simplicidade construímos um mundo melhor.

Agradeço ao nosso eterno “Dim”, sempre presente, e que muito me inspira por seu exemplo de determinação e profissionalismo.

Agradeço a esta universidade e todos aqueles que se esforçam diariamente para mantê-la como uma referência de ensino e pesquisa. De modo especial aos professores do Departamento de Medicina Veterinária, que se dedicam com imensa pujança ao ensino e compartilhamento de seus conhecimentos. Suas palavras nos formaram, e seus exemplos nos motivam.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da Universidade Federal de Lavras e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por todo suporte administrativo, financeiro, e estrutural que viabilizaram este trabalho e que fortalecem o desenvolvimento técnico científico no país.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Sendo o pescado uma das fontes de proteína animal mais consumidas no mundo, a preocupação com medidas sanitárias dos plantéis e com a qualidade dos produtos produzidos torna-se cada vez mais latente. A busca por ações terapêuticas mais assertivas é um fator importante para viabilidade sanitária de produção, para a saúde pública e um potencial influenciador na qualidade da carne produzida. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da temperatura no perfil farmacocinético dos animais em tratamento visando a otimização do fármaco, eficiência terapêutica e segurança do alimento. Foram utilizados 204 animais (*Oreochromis niloticus*) submetidos a diferentes temperaturas, sendo divididos em quatro grupos de 14°C, 21°C, 28°C e 32°C durante tratamento com florfenicol a 10mg/kg por 10 dias consecutivos por via oral, e em concentrações de 500ppm e 200ppm em banho de imersão por 5 dias. Posteriormente utilizou-se o programa Monolix 2020 da Lixoft® para análises de farmacometria e determinação de parâmetros farmacocinéticos, observando-se a variação destes parâmetros em relação a temperatura de criação dos animais. Também foram avaliadas condições de oxidação dos files, para estabelecer uma provável correlação entre o uso do fármaco e alterações no tempo de prateleira do produto, onde não se observou uma relação entre a temperatura de criação e a oxidação dos filés.

Palavras-chave: Antibióticos, farmacocinética, pescado, carcaças, T-bars.

## ABSTRACT

As fish is one of the most consumed animal protein sources in the world, the concern with sanitary measures for the flocks and with the quality of the products produced is becoming increasingly latent. The search for more assertive therapeutic actions is an important factor for the sanitary viability of production, for public health and a potential influence on the quality of the meat produced. This study aimed to evaluate the influence of temperature on the pharmacokinetic profile of animals undergoing treatment, aiming at drug optimization, therapeutic efficiency and food safety. A total of 204 animals (*Oreochromis niloticus*) were subjected to different temperatures, being divided into four groups of 14°C, 21°C, 28°C and 32°C during treatment with florfenicol at 10mg/kg for 10 consecutive days orally, and in 500ppm and 200ppm in concertations in soaking bath for 5 days. Subsequently, the Monolix 2020 program from Lixoft® was used for pharmacometric analysis and determination of pharmacokinetic parameters, observing the variation of these parameters in relation to the temperature at which the animals were raised. Oxidation conditions of the files were also evaluated, to establish a probable correlation between drug use and changes in the shelf life of the product, where a relationship between the temperature of creation and the oxidation of the fillets was not observed.

Keywords: Antibiotics, pharmacokinetics, fish, carcasses, T-bars.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1- Eixo hipotálamo-hipófise-interrenal frente à regulação endócrina de cortisol, e as respostas primárias, secundárias e terciárias frente ao estresse. ....	11
Figura 2 - Influência do consumo alimentar em função da temperatura de criação da tilápia. ....	13
Figura 3- Estrutura Molecular Florfenicol.....	15
Figura 4 - Concentrações Inibitórias Mínimas de Cepas Bacterianas Isoladas no Brasil. (A) Distribuição das cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i> no Brasil de acordo com os valores MIC para florfenicol. (B) Distribuição de cepas de <i>Aeromonas spp.</i> no Brasil de acordo com os valores de MIC para florfenicol. ....	18
Tabela 1 - Composição e níveis de garantia da ração comercial adquirida para manejo alimentar dos animais em experimento.....	24
Figura 5 - Valores iniciais e após armazenamento a -20°C por 90 dias de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico, expressado em mg de Malonaldeído (MDA) por kg de musculo de tilápias ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) tratadas com florfenicol (10 mg/kg), via oral, durante 10 dias, abatidas em diferentes tempos após tratamento.....	30
Figura 6 - Valores de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico, expressado em mg de Malonaldeído (MDA) por kg de musculo de tilápias ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) criadas a 21°C, 28°C e 32°C, tratadas com florfenicol (10 mg/kg), via oral, durante 10 dias, abatidas em diferentes tempos após tratamento e armazenados a -20°C por 90 dias. Linha tracejada indicando valor considerado crítico de deterioração do pescado (1mg/kg de MDA).....	31
Figura 7 - Valores médios de concentração plasmática de florfenicol observados (pontos azuis) nos grupos experimentais do estudo de farmacocinética em tilápias do Nilo realizado de RAIROT et al (2019) e valores médios preditos pelo modelo construído (linha contínua).....	32
Figura 8 - Valores de concentração plasmática de florfenicol observados (pontos azuis) e preditos (linha preta). A linha de pontos indica o intervalo de confiança de 95% dos valores preditos.....	33
Figura 9 - Mediana, percentil 5 e percentil 95 dos valores observados (linha continua azul, e preditos linhas descontinua preta) da concentração plasmática de florfenicol em tilápia. As sombras indicam o intervalo de 95% de confiança dos valores preditos.....	34
Figura 10 - Caixa de bigodes do tempo de latência de absorção (Tlag), constante de absorção (Ka), depuramento (Cl) e volume de compartimento 1 (V1) de florfenicol em tilápia segundo as temperaturas de 24°C, 28°C e 32°C.....	35

Figura 11 - Correlação do tempo de latência de absorção ( $T_{lag}$ ), constante de absorção ( $K_a$ ), volume de compartimento 1 ( $V_1$ ) e depuramento ( $Cl$ ) de florfenicol em tilápia com as temperaturas de 24°C, 28°C e 32°C (n=12).....37

Figura 12 - Simulação das médias móveis das concentrações plasmáticas de florfenicol após a administração por gavagem de 10, 15 e 20 mg/kg a cada 24hs durante 10 dias em tilápias de Nilo, criadas à 18°C, 21°C, 26°C e 32°C (n=1000).....38

Figura 13 - Simulação das concentrações plasmáticas de florfenicol após a administração por gavagem de 10, 15 e 20 mg/Kg a cada 24hs durante 10 dias em tilápias de Nilo, criadas à 18°C, 21°C, 26°C e 32°C (n=12).....39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
CEMADEM	Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Cl	Depuramento
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IN	Instrução Normativa
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
K <sub>a</sub>	Constante de Absorção
LMR	Limite Máximo de Resíduo
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MDA	Malonaldeído
MIC	Concentração Inibitória Mínima
PD	Farmacodinâmica
PK	Farmacocinética
PNCRC	Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
Tlag	Tempo de Latência
V <sub>1</sub>	Volume de Compartimento 1

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
2.1 Cenário da Aquicultura Mundial e Nacional .....	8
2.2 Temperatura da água e sua influência em peixes.....	10
2.3 Antibioticoterapia e Florfenicol .....	13
2.4 Modelamento PK/PD .....	19
2.5 Potencial interferência de antibióticos na qualidade de carne .....	20
2.6 Detecção de Resíduos .....	21
3. OBJETIVOS .....	23
3.1 Objetivo Geral.....	23
3.2 Objetivos Específicos .....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Manejo Alimentar .....	24
3.2 Obtenção dos animais .....	24
3.3 Delineamento Experimental .....	25
3.3.1 ENSAIO 1 .....	25
3.3.2 ENSAIO 2 .....	26
3.3.3 ENSAIO 3 .....	27
3.3.4 Elaboração da ração medicamentosa com adição de florfenicol.....	27
3.3.5 Elaboração do banho de imersão com Florfenicol .....	28
3.4 Oxidação (T-Bars) .....	28
3.5 Análise dos dados .....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
4.1 Manejo Terapêutico (Ensaio 1 e 2).....	29
4.2 Oxidação Lipídica/Shelf Live (Ensaio 1) .....	30
4.2 Modelamento Farmacocinético (Ensaio 3) .....	32
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	40
6 CONCLUSÕES .....	41
3 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO .....	42

## 1. INTRODUÇÃO

No cenário internacional o Brasil se impõe com grande pujança como um dos mais importantes produtores agropecuários mundiais. Esse patamar foi alcançado pelo grande empenho e incentivo ao desenvolvimento técnico-científico tanto na área agrícola, quanto na pecuária, que hoje são pilares econômicos do Brasil. Na produção de proteína de origem animal o país se destaca como o maior exportador de carne bovina (USDA, 2020), maior exportador de carne de frangos (USDA, 2020), terceiro maior exportador de carne suína (USDA, 2020), e seguindo essa tendência de forte produção pecuária já protagoniza como quarto maior produtor mundial de tilápia segundo a Associação Brasileira de Piscicultura-PEIXE BR (2020), com grande tendência de crescimento.

O desenvolvimento brasileiro de produção aquícola se deve além da tradição e consolidação do país no setor agropecuário, mas também ao grande potencial de exploração de forma sustentável dos abundantes recursos hídricos presentes no país. Assim o desenvolvimento e utilização de diversos sistemas de criação, em diversas condições climáticas observadas ao longo do ano em todo território nacional, traz desafios sanitários importantes para os plantéis de produção. Apesar da grande amplitude térmica que algumas espécies comerciais podem suportar, estas oscilações de temperatura representam um fator de risco para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, que associados à mudanças metabólicas dos animais para adequação às condições climáticas, pode levar a altos índices de mortalidade.

Devido à restrição aos fármacos de uso veterinário legalmente disponíveis para tratamentos terapêuticos na aquicultura, é fundamental a utilização adequada e assertiva destes disponíveis. A otimização dos fármacos contribui para evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana, bem como pode resultar em otimização financeira para os produtores. A compreensão dos fatores biológicos afetados pelas variáveis de produção (como a temperatura), é fundamental para adequada otimização dos medicamentos, garantindo eficiência terapêutica e produção de produtos isentos de resíduos.

Visando assim o crescimento de produtividade nacional e a preocupação com padrões higiênicos-sanitários dos produtos de origem animal, isentos de resíduos e contaminantes, esta pesquisa propõe um estudo sobre a interferência da temperatura em

condições farmacocinéticas de tilápias durante o tratamento com florfenicol, considerando-se a otimização do fármaco com eficácia terapêutica e segurança dos alimentos.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Cenário da Aquicultura Mundial e Nacional**

A aquicultura é uma atividade em contínuo crescimento de maneira geral em todo mundo. Apesar da pesca de captura ainda expressar grande produção teve uma aparente estagnação desde os anos 1980, havendo a partir desta época até os dias de hoje um aumento significativo dos sistemas de produção e cultivo, sendo a aquicultura responsável por 52% do fornecimento de pescados para consumo humano, como mostra os levantamentos da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação-FAO (2018). No cenário mundial destacam-se o cultivo do grupo das carpas, seguido imediatamente da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) (FAO,2018), já no Brasil o cultivo de tilápias assume maior relevância sendo a primeira espécie em volume de produção com 239,09 mil toneladas despescadas em 2016, tendo uma representatividade de 47,1% do total da piscicultura brasileira (IBGE, 2016).

Ainda segundo os apontamentos levantados pela FAO (2018), o pescado é a proteína de origem animal mais consumida em todo mundo, sendo também o desenvolvimento e fortalecimento pleno da pesca e da aquicultura, peças importantes para a segurança alimentar e nutricional em um mundo mais justo e sustentável. As projeções estatísticas divulgadas indicam ainda um importante crescimento de 33% do consumo de pescado até 2030 na América Latina e Caribe (FAO, 2020). Esta tendência de expansão é uma grande oportunidade para o desenvolvimento econômico da região, maior geração de renda, e maior disponibilidade de proteína animal para a população.

O Brasil apresenta grande potencial de expansão de produção aquícola, em especial de cultivo da tilápia, espécie bem adaptada e com bom rendimento produtivo. A tilapicultura é uma atividade de importante relevância para o país, sendo uma produção economicamente rentável pra os produtores e assumindo caráter relevante no âmbito socioeconômico de vários polos produtivos. A produção estimada do setor teve um incremento no país, entre os anos de 2005 a 2015 de 356%, chegando a aproximadamente 330.000 toneladas (BARROSO et al, 2018). Dados publicados no

Anuário da Associação Brasileira de Piscicultura (2020), apontam um fechamento de produção de 758.006 toneladas no ano de 2019, onde a tilápia se consolida como espécie de maior cultivo, representando 57% de toda produção nacional. Este cenário contribui para o desenvolvimento social e fortalecimento do agronegócio nacional, fomentando a comercialização de produtos e a geração de empregos em toda a cadeia de produção, desde centrais de alevinagem, fábricas de ração, fabricas de equipamentos, indústrias frigoríficas e de processamento e centrais de distribuição, além dos setores secundários e auxiliares da atividade.

Dentre o extenso território nacional brasileiro os cinco maiores produtores encontram-se nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, sendo eles o estado do Paraná com grande destaque de maior produtor, apresentado um volume de 146.212 toneladas produzidas em 2019, seguido do estado de São Paulo com 64.900 toneladas produzidas, logo após o estado de Santa Catarina (38.559 toneladas), Minas Gerais (36.350 toneladas) e ocupando o quinto lugar no ranking de produção o estado de Pernambuco com uma produção de 25.421 toneladas (PEIXE BR, 2020).

Nesta perspectiva de difusão das regiões com grande potencial produtivo ao longo de todo país, evidencia-se nitidamente um desafio de padronização dos manejos produtivos, uma vez que as temperaturas médias ao longo do ano nas diversas regiões devem direcionar a manejos diversificados. Estudos de CASAROLI et al (2018), trazem uma representação das normais climatológicas no Brasil, onde pode-se observar uma temperatura média muito distinta nas diversas regiões, com o predomínio de médias entre 13 e 19°C no Sul do país e de 22 a 29°C em média no Nordeste. O Anuário Climático do Brasil do ano de 2019, publicado em conjunto pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) e o Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais (CEMADEN), trazem a observação de uma temperatura média anual no país de 25°C, com máxima anual de 31°C e mínima de 20,3°C (RAMOS et al, 2020).

Assim, devido ao crescimento e potencial expansão da atividade aquícola no Brasil, a atenção às particularidades regionais e os desafios que estas podem trazer, como alterações de temperatura devem ser levadas em consideração para adequação dos manejos produtivos, nutricionais e sanitários.

## 2.2 Temperatura da água e sua influência em peixes

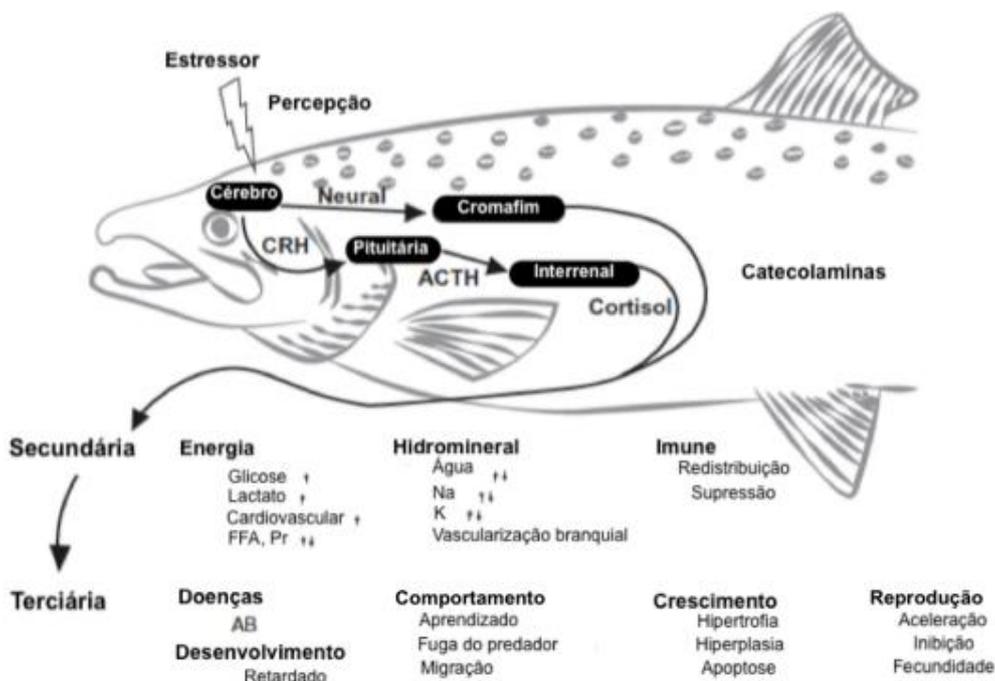
De maneira geral os peixes são diretamente afetados pelas condições térmicas da água, uma vez que, mantém sua temperatura corporal muito próxima do ambiente, graças aos fatores de trocas de energias térmicas condutivas (que se dá pelo contato direto da superfície corporal com a água) e convectivas (que ocorre pelo movimento da água na superfície do corpo, ou ainda pela circulação sanguínea transportando calor dos tecidos para a superfície corporal do animal) (LEONEL, 2011), sendo ectotérmicos a maioria das espécies de importância econômica. Algumas espécies ainda conseguem reter calor em partes do corpo como alternativa para viabilização de uma natação rápida e contínua, caso necessário, e também para manutenção de atividades metabólicas (ZENI et al, 2016).

Alterações na temperatura da água implicaram em respostas fisiológicas e comportamentais, como o aumento da frequência cardíaca e respiratória dos animais submetidos a altas temperaturas, estas alterações fisiológicas se dão pelo aumento proporcional das taxas de despolarização das células marca-passo do coração (ZENI et al, 2016) em uma tentativa orgânica de manutenção da homeostasia. Em condições de alterações térmicas ocorrem também mudanças metabólicas importantes a nível celular, e molecular, podendo afetar a velocidade de reações químicas, as ligações moleculares e/ou até mesmo alterando rotas metabólicas (LEONEL, 2011), (ZENI et al, 2016).

Mudanças acentuadas na amplitude térmica considerada ótima para a manutenção dos animais, como pode ocorrer ao longo do ano durante a produção, podem levar os peixes a uma condição de estresse térmico. Esse estresse acarreta em alterações metabólicas semelhantes às causadas ou por outros agentes estressantes, ocasionando uma resposta primária, secundária e terciária, todas visando um conjunto de respostas fisiológicas e metabólicas para manutenção da homeostasia, também descritas como reação de alarme, reação de resistência ou adaptação e o estágio de exaustão, respectivamente (BARCELLOS et al, 2000). As respostas primárias observadas nos animais submetidos a estresse são de ordem neuroendócrina (Figura 1), uma vez que após percepção por receptores nervosos e centros térmicos de temperaturas fora da zona ideal de conforto térmico há a liberação de catecolaminas, adrenalina, noradrenalina, que serão liberadas pelas células cromafins em resposta ao estímulo do sistema simpático, e liberação de hormônios corticosteroides no corpo (BARCELLOS

et al, 2000), (PRZEPIURA, 2016). Esta primeira resposta é desencadeada quando o núcleo paraventricular do hipotálamo sensibilizado pelo agente estressante (temperatura) libera o fator liberador de corticotrofina, desencadeando estímulo à hipófise que liberará o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), este após entrada na corrente sanguínea chega as células interrenais possibilitando a síntese e liberação de cortisol com aumento dos seus níveis sistêmicos (BARCELLOS et al, 2000), (GUERRERO, 2017).

**Figura 1-** Eixo hipotálamo-hipófise-interrenal frente à regulação endócrina de cortisol, e as respostas primárias, secundárias e terciárias frente ao estresse.



**Fonte:** Adaptado de SCHERECK & TORT, 2016

O cortisol tem uma ação sistêmica muito diversificada atuando em todo organismo, e nos mecanismos de compensação homeostáticos, desde interações iônicas até a interferência no sistema renal, cardiovascular, imune e outras correlações metabólicas (GUERRERO, 2017). Caso o agente estressante persista os hormônios corticosteroides, em especial o cortisol, começa a induzir alterações metabólicas sistêmicas, levando a respostas secundárias ao estresse. Uma importante alteração metabólica causada pelo

cortisol esta relacionada a mudanças no metabolismo hepático, onde há uma diminuição da resposta dos hepatócitos à insulina, evitando a entrada de glicose nestas células, mecanismo que auxilia a ação hiperglicemiante deste hormônio. Concomitantemente o organismo busca a manutenção de altas taxas glicêmicas através da gliconeogênese pela quebra de fontes lipídicas e/ou proteicas (BARCELLOS et al, 2000).

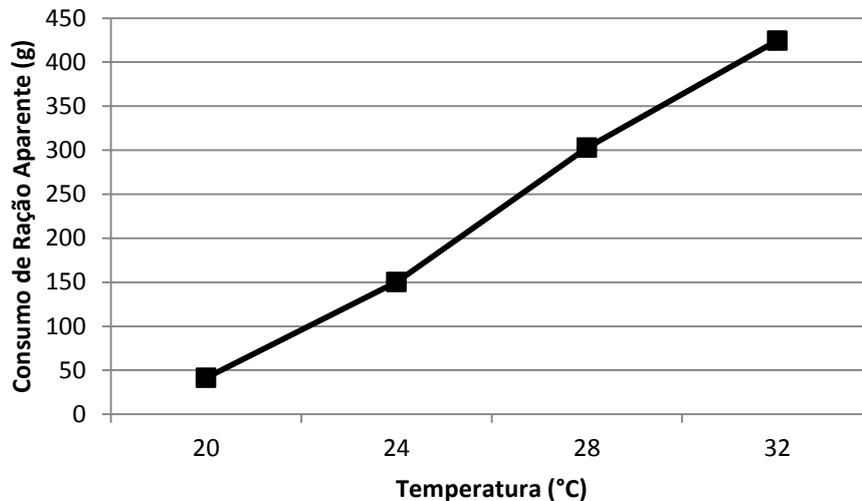
Outra importante interação do cortisol é com o sistema imune, levando este a uma supressão pela diminuição de linfócitos circulantes na corrente sanguínea. Fato que já vem sendo descrito desde 1987 por KAATARI & TRIPP, que demonstram que o cortisol é responsável pela inibição de interleucinas interferindo na diferenciação das células precursoras dos linfócitos. O que é ratificado em trabalhos recentes que mostram uma importante correlação dos mecanismos de interferência dos glicocorticoides no sistema imune (CAIN & CIDLOWSKI, 2017).

Caso o agente causador de estresse se mantenha além das condições de adaptação dos animais, estes então entram em uma fase terciária de esgotamento ou exaustão, onde o animal tem suas condições de crescimento, reprodução e desenvolvimento em geral cessadas, podendo afetar em último caso as condições de sobrevivência dos animais (PRZEPIURA, 2016).

Concomitantemente às alterações fisiológicas em especial pelas respostas ao estresse térmico, os peixes apresentam significativas mudanças metabólicas, além das já citadas, que são de extrema relevância e impacto no seu comportamento. Ajustes cardiovasculares e respiratórios são observados em resposta às necessidades de manutenção das taxas vitais e podem ocorrer também alterações de sínteses enzimáticas, nos produtos de rotas metabólicas e até a substituição de formas moleculares com mesma especificidade (ZENI et al, 2016).

As alterações de temperatura nos animais implicam também no seu comportamento levando a alterações de natação, tentativas de mudanças para ambientes mais propícios e alterações de comportamento alimentar, o que já é relatado na literatura e esta ilustrado na Figura 2, com dados de trabalho de MOURA et al, 2007.

**Figura 2** - Influência do consumo alimentar em função da temperatura de criação da tilápia.



**Fonte:** Adaptado de MOURA et al, 2007.

Os dados trazidos por MOURA et al (2007) corroboram com a observação de mudanças comportamentais das tilápias frente as alterações metabólicas em decorrência das variações térmicas, em especial na busca por alimentação de forma voluntária. ROCHA LOURES et al (2008) também já haviam demonstrado a correlação com mudanças térmicas do ar interferindo diretamente na temperatura da água e consequentemente na repleção estomacal dos animais.

Mudanças nestes fatores fisiológicos, metabólicos e comportamentais podem levar a necessidade de ajustes nos tratamentos empregados em potenciais animais convalescentes.

### **2.3 Antibioticoterapia e Florfenicol**

Com o aumento e intensificação da produção, surgem também lacunas e cuidados necessários frente a problemas emergentes. O cultivo animal intensificado favorece, por exemplo, o desenvolvimento de microrganismos patogênicos para os animais, e alguns de importância para a saúde pública dos consumidores, como o caso de bactérias e parasitas. Os peixes de cultivo podem ser acometidos por infecções causadas por uma gama muito variada de bactérias, entre elas as *Aeromonas spp*, *Streptococcus spp*, *Edwardsella spp*, *Flavobacterium columnare* e *Francisella spp*,

estas de maior ocorrência e grande impacto na produção brasileira (LEIRA, 2016). Agentes estressantes como as variações de temperatura durante a produção são fatores de risco para infecções e o desenvolvimento de doenças, uma vez que como já citado estas oscilações térmicas interferem em condições fisiológicas e também podem deprimir a resposta imune (GUERRERO, 2017), (CAIN & CIDLOWSKI, 2017).

Para controle sanitário dos plantéis frente às infecções bacterianas é muito difundido o uso de antibióticos em larga escala na produção animal, porém vários estudos demonstram os riscos relacionados com o mau uso destes fármacos, como a presença de resíduos acima do limite máximo estabelecido pelo CODEX Alimentares em produtos alimentícios de origem animal (GÁLVEZ et al, 2018; CHEN et al, 2019). Além disso, o surgimento acelerado de resistência bacteriana relacionada à presença de resíduos nos tecidos de tilápias já foi descrito por MONTEIRO et al (2016), demonstrando uma preocupação latente da necessidade de um uso racional destes fármacos para produção.

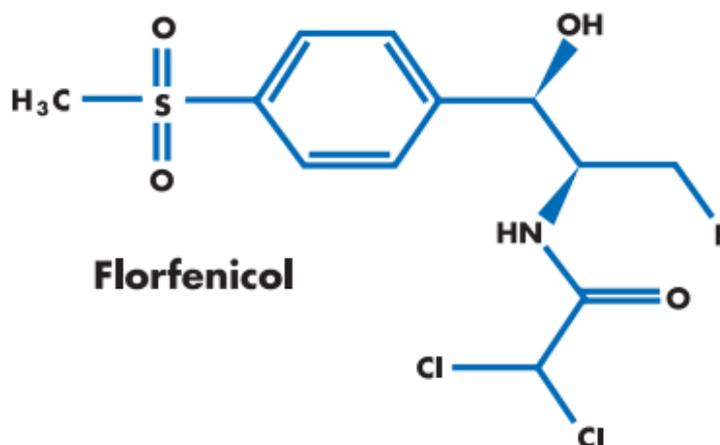
Além do uso indiscriminado de antibióticos, outros cuidados devem ser observados em especial na piscicultura, onde vários parâmetros podem alterar a farmacodinâmica e farmacocinética durante o tratamento. Estudos recentes de RAIRAT et al (2019), demonstram que alterações de temperatura da água interferem diretamente na distribuição de florfenicol no corpo de tilápias, evidenciando que a dose mínima inibitória (MIC) para combater os patógenos desejados, vai ser alterada em condições de manejo térmico da água. A compreensão destas alterações farmacológicas com o meio e condições de tratamento podem favorecer a otimização do uso de antibióticos, determinando uma dosagem ótima de acordo com as condições de manejo e a melhor via de administração dos fármacos.

De maneira generaliza para tratamentos de plantéis de peixes é comumente empregado na piscicultura a administração de antibióticos por via oral adicionado à ração, ou de maneira alternativa por banhos de imersão. As diferentes vias de administração no entanto afetam também os parâmetros farmacocinéticos (INTORRE et al, 2000) e, tem suas vantagens e desvantagens em relação a suas aplicações. A via oral adicionada à ração é mais comumente utilizada pela facilidade de manejo, ao passo que a administração oral via gavagem (intra-esofágica) é bem aceita para experimentação e conhecimento a cerca de parâmetros básicos de farmacocinética como utilizado por

RAIRAT et al (2020), em contra partida seu emprego seria muito dificultado em grandes produções. Outra via empregada na piscicultura é por banho de imersão, bem aceita em casos de animais anoréxicos e de pequeno porte que são facilmente manipulados, porém apresenta como efeito limitante a ação sobre bactérias ambientais benéficas para o ambiente do animal, maior lixiviação, aumento do custeio de tratamento devido a necessidade de maiores concentrações em grandes volumes de água (LEWBART et al, 1997).

No âmbito da antibioticoterapia na piscicultura, o florfenicol figura como um importante fármaco aprovado para o tratamento terapêutico no cultivo aquícola. Com estrutura química  $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$ , o florfenicol é um análogo do cloranfenicol, sendo um derivado monofluorado de tianfenicol, da classe dos anfenicois, o qual tem sua estrutura molecular representada na Figura 1 (SCHERING-PLOUGH, 2004). O florfenicol tem extrema importância ainda para a medicina veterinária como um todo, sendo um fármaco de eleição para tratamento de bacterioses, uma vez que foi desenvolvido para uso animal sendo um dos raros antimicrobianos destinados exclusivamente para tratamento animal, não sendo empregado na medicina humana. Este fármaco tem uma ação de amplo espectro, onde sua ação esta baseada na ligação da subunidade ribossomal 50s das bactérias, levando assim a inibição da síntese proteica e estagnação e morte dos microrganismos, sendo efetivo assim tanto para bactérias Gram-positivas, quanto para Gram-negativas (SCHERING-PLOUGH, 2004).

**Figura 3-** Estrutura Molecular Florfenicol



**Fonte:** Aquaflor. Technical Monograph for catfish health professional (2005).

O uso otimizado de antibióticos pode ser uma estratégia importante visando maior rentabilidade financeira, mas sobre tudo deve ser uma ferramenta eficaz de controle sobre a resistência microbiana. Genes de resistência a florfenicol já foram caracterizados em bactérias de importância para a saúde humana (WU et al, 2019), e há grande preocupação em relação a rápida transferência e adaptação dos mecanismos de resistência das bactérias.

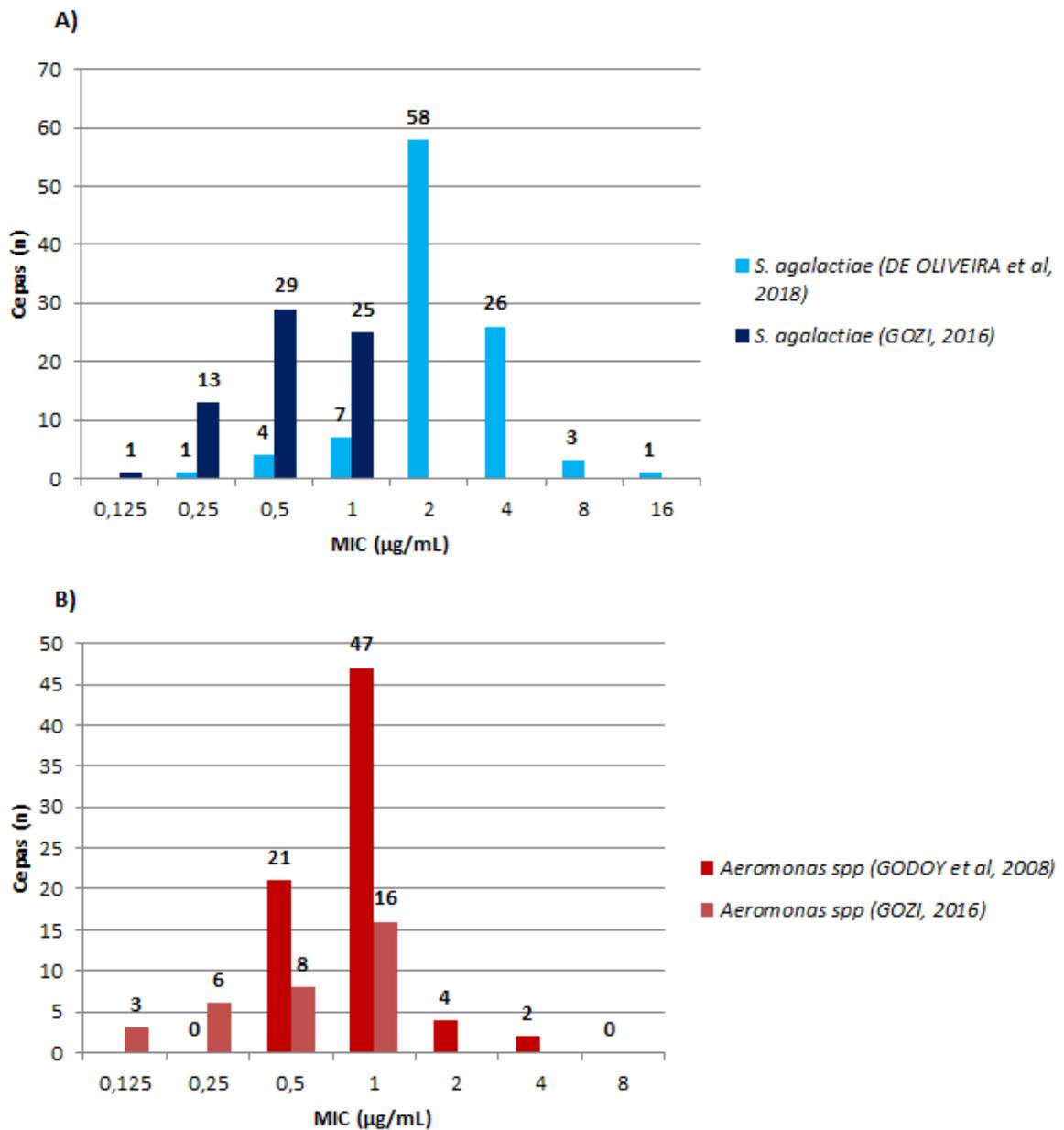
A preocupação a cerca da acelerada aquisição de resistência bacteriana por parte de alguns patógenos e o lento desenvolvimento e sintetização de fármacos são latentes no cenário mundial. Assim algumas ferramentas e estratégias de controle vem sendo implementadas e preconizadas por órgãos de saúde, como o conceito dos R's de uso racional de antimicrobianos preconizado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), (LLOYD & PAGE, 2018).

Dentro deste conceito objetiva-se a implementação de ações que visem a consolidação da Responsabilidade (Primeiro "R" do inglês Responsibility) daqueles que tem o conhecimento técnico e o amparo legal para prescrição, indicação e implementação de tratamento com o uso destes fármacos. A Redução (Reduction) continua no uso dos antibióticos, principalmente no que se diz respeito ao emprego em larga escala na produção animal, o refinamento (Refinement) constante buscando-se sempre o emprego correto em consideração a correta dosagem, pelo tempo correto, respeitando para isso, a particularidade de cada animal. Também é preconizado a Substituição (Replacement) sempre que possível nos tratamentos infecciosos que não necessariamente necessitam do emprego de antibióticos para seu enfrentamento. Por fim, é proposto a Revisão (Review) ininterrupta do uso e das políticas de emprego de tratamentos antimicrobianos, uma vez que, ao lidarmos com o enfrentamento de microrganismo, estamos sujeitos a variáveis distintas de resistência e mutações que podem alterar as características de susceptibilidade destes organismo frente ao tratamento estabelecido (LLOYD & PAGE, 2018).

A compreensão da biologia e susceptibilidade das bactérias frente aos fármacos antibióticos pode ser mensurada e acompanhada pelos valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) que prediz o valor mínimo em concentração para se atingir uma ação efetiva contra determinada espécie de microrganismo.

O conhecimento do perfil de susceptibilidade antimicrobiana de microrganismos locais e regionais também é de fundamental importância para o enfrentamento mais assertivo das infecções, uma vez que em regiões distintas com variáveis de condições ambientais, podem ocorrer mudanças e aquisição de mecanismos de resistência distintos. Estudos (GOZI, 2016; DE OLIVEIRA et al, 2018; GODOY et al, 2008), avaliaram a susceptibilidade frente ao florfenicol de cepas de bactérias de importância na piscicultura isoladas no Brasil. Nestes foi detectado uma prevalência de *Aeromonas spp* com uma MIC de 1 µg/mL, como demonstrado na Figura 4(B). Já para isolados de *Streptococcus*, no país, as MICs variaram de 0,125 a 16 µg/mL, com maior prevalência na de isolados apresentando MIC de 2 µg/mL (Figura 4, A).

**Figura 4** - Concentrações Inibitórias Mínimas de Cepas Bacterianas Isoladas no Brasil. (A) Distribuição das cepas de *Streptococcus agalactiae* no Brasil de acordo com os valores MIC para florfenicol. (B) Distribuição de cepas de *Aeromonas spp.* no Brasil de acordo com os valores de MIC para florfenicol.



**Fonte:** Adaptado de GOZI (2016), DE OLIVEIRA et al (2018) e GODOY et al (2008).

Tendo em vista a determinação das concentrações inibitórias mínimas das bactérias de interesse, estes valores terão aplicação prática associando-se aos conhecimentos das taxas de concentração do fármaco administrado no animal. Possibilitando assim a realização de um modelamento Farmacocinético/Farmacodinâmico (PK/PD) para melhor enfrentamento das infecções.

#### **2.4 Modelamento PK/PD**

Para se determinar a eficácia de um medicamento frente a determinado patógeno é necessário o conhecimento dos fatores de suscetibilidade do patógeno de interesse ao fármaco usado, sendo este um parâmetro importante de farmacodinâmica (PD). Além disso, é igualmente fundamental a compreensão dos fatores farmacocinéticos (PK) como a distribuição e a concentração plasmática alcançada no organismo dos animais. Posteriormente podem-se combinar os dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos para uma terapia mais assertiva.

Para a determinação de fatores de suscetibilidade de uma bactéria a determinado antibiótico podemos utilizar alguns métodos, dentre eles a diluição em caldo, que consiste em expor o microrganismo em concentrações conhecidas e em diluições fracionadas do mesmo. Após a realização dos testes é possível a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) daquele fármaco para se alcançar um efeito inibitório satisfatório nas bactérias. Ademais, a eficácia de fármaco dependerá também de vários fatores que podem interferir na CIM, como a capacidade do medicamento de penetrar no organismo (BOOTHE, 2011).

Além dos dados de sensibilidade, que diz respeito a parâmetros farmacodinâmicos, também é fundamental para refinamento dos tratamentos clínicos, o conhecimento de como os fármacos se distribuem no organismo (PK) assim como realizado por LEN & CHEN (2021). Cada fármaco atinge diferentes concentrações nos pacientes, em função de variáveis como a dose administrada, das taxas de absorção e eliminação do volume de distribuição e do estado fisiológico e metabólico dos animais, que pode interferir nessas constantes.

A partir de estudos prévios é possível então, determinar uma correlação entre a concentração necessária em relação à que é alcançada no corpo do animal. Os modelamentos baseiam-se na aplicação de funções matemáticas para predição das

funções farmacocinéticas e farmacodinâmicas, podendo ser extrapolado a posteriori para determinação de variações de doses e concentrações farmacêuticas.

O modelamento PK/PD permite então prever, a partir da entrada de informações como concentração ao longo do tempo em um resultado sobre o efeito esperado na diminuição de bactérias, ou seja, em eficácia terapêutica (DOREI et al, 2017)

Levantamentos prévios de parâmetros que demonstrem a susceptibilidade dos patógenos de interesse ao fármaco estudado são extremamente importantes para determinação de eficácia. Esses parâmetros são estabelecidos após isolamento das cepas encontradas e determinação das concentrações mínimas de fármaco necessário para seu combate, a exemplo o trabalho realizado por GOZI, 2016. Os estudos epidemiológicos de levantamento da susceptibilidade das bactérias frente a um fármaco corroboram então, para a compreensão das características farmacodinâmicas de interesse.

Desta forma a associação de estudos e trabalhos de farmacocinéticos e farmacodinâmicos (PK/PD) auxilia a aplicação de tratamentos mais assertivos através da predição de dosagens em diversos cenários. Os conceitos de revisão, redução, refinamento e substituição dentro da ótica dos 5R's são portanto, abrangidos nestes trabalhos, contando ainda com a atividade dos pesquisadores que não se eximam de suas responsabilidades frente ao enfrentamento terapêutico e das resistências antimicrobiana.

## **2.5 Potencial interferência de antibióticos na qualidade de carne**

A maior finalidade de produção aquícola em grande escala se deve para obtenção e consumo da carne advinda destes animais. Assim, é de extrema relevância a preocupação e o conhecimento profundo das possíveis alterações que determinados manejos ao longo dos ciclos produtivos podem impactar na qualidade da carne. Neste sentido estudos de COTRIM (2010) já demonstraram que pode haver uma interferência significativa na qualidade de carne de outras espécies (frangos de corte), quando estes são submetidos a manejos de tratamento com administração de antibiótico adicionado a ração.

Dentre os diversos métodos utilizados para determinação da qualidade das carnes, a observação dos índices de oxidação lipídica é um dos grandes indicativos da qualidade das mesmas, uma vez que determina o estado de oxidação dos compostos voláteis presentes no produto, sendo considerada ainda a determinação de deterioração mais importante nas carnes, determinante para a elucidação do tempo de prateleira destes produtos, em especial para predição da rancidez dos pescados (OSAWA et al, 2005).

Para predição do tempo de prateleira dos produtos cárneos e determinação de oxidação dos compostos voláteis o teste mais empregado é denominado de T-bars, assim conhecido por quantificar a presença de malonáldo (MDA) nas amostras cárneas avaliadas. Esta quantificação é determinante por ser, o malonáldo, um dos principais produtos da decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos polinsaturados formados durante o processo oxidativo. Para a execução do teste submete-se o processamento das amostras a serem avaliadas, ao ácido tricloroacético (TCA) e posteriormente à reação com ácido 2-tiobarbiturico (TBA) gerando uma reação colorimétrica, que pode ser quantificada por determinação de espectrofotometria, sendo o resultado expresso em mg de malonáldo por kg de amostra (OSAWA et al, 2005).

O possível impacto do uso de florfenicol na qualidade dos files de tilápias durante o tratamento destes animais ao longo dos sistemas de criação não é amplamente conhecido ou relatado na literatura científica. Evidencia-se assim a necessidade de seu estudo amplo para elucidação a cerca de uma produção mais assertiva.

## **2.6 Detecção de Resíduos**

Outro fator intrínseco à qualidade da carne consumida é a ausência de resíduos de drogas e contaminantes no produto, preocupação constante e crescente no cenário mundial (LEN & CHEN, 2021). No Brasil a preocupação com a segurança dos alimentos no âmbito de resíduos, se estende para a aplicação de legislações que regulamentam as concentrações de Limite Máximo de Resíduos (LMR) permitidos nos diversos produtos de origem animal através da Instrução Normativa nº 9 de 21 de Fevereiro de 2017 (BRASIL, 2017).

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) estabelecido pela referida IN 9/2021 do Ministério da Agricultura Pecuária e

Abastecimento (MAPA), em suas especificações acerca do plano de amostragem de pescados, determina a verificação, entre outras substâncias, de florfenicol em um limite máximo de 1000µg/kg na musculatura coletada. Padrão mínimo este exigido para comercialização segura desta carne.

A detecção de resíduos em tecidos é avaliada por métodos analíticos quantitativos através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), técnica amplamente utilizada e padronizada em pesquisas e estudos recentes (TÜRE et al, 2019; YANG et al, 2018; RAIRAT et al ,2019). Através da HPLC pode-se determinar portanto se alterações na temperatura resultariam em mudanças no período de carência do fármaco uma vez que, como já citado, já foi demonstrado que a temperatura influencia a farmacodinâmica do medicamento administrado. Porém estas mudanças necessitam de maior elucidação para uma compreensão mais precisa das interações farmacológicas, o que possibilitaria um uso mais otimizado e racional do fármaco.

Observando-se portanto, a importância econômica e social da produção e do consumo de tilápias, e a grande amplitude térmica em que estão submetidos os sistemas de criação no Brasil. Sendo de suma importância o conhecimento de variáveis que podem interferir na farmacodinâmica e farmacocinética durante o tratamento dos animais. O que pode contribuir para o uso otimizado e consciente de antibióticos e favorecer a segurança dos alimentos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho tem como objetivo principal avaliar a influência da temperatura no perfil farmacocinético durante o período de tratamento de tilápias com o uso de florfenicol, considerando-se a otimização de fármacos com eficácia terapêutica e segurança de alimentos.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- a) Avaliar a efetividade do manejo terapêutico através da administração de antibióticos via oral adicionado à ração, em animais criados em baixas temperaturas.
- b) Avaliar o efeito da temperatura de criação e do tempo de abate após tratamento com florfenicol no Tbars dos músculos armazenados a -20°C por 90 dias.
- c) Criar um modelo farmacocinético de florfenicol em plasma de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes temperaturas de tratamento.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Manejo Alimentar

Para o manejo alimentar dos animais ao longo do experimento foi adquirido e ofertado uma ração comercial com os níveis de garantia baseados nas exigências da espécie. A composição completa da ração é discriminada na Tabela 1, com as informações provenientes no fornecedor.

A quantidade inicial de ração ofertada foi baseada em uma proporção de 2 a 5% de ração em relação ao peso vivo dos animais. Posteriormente à aclimação de temperaturas esta proporção se alterou, sendo observado um consumo máximo diferente entre os animais dos diferentes tratamentos.

Para a administração medicamentosa a ração se manteve a mesma, sendo apenas incorporado o fármaco através de um veículo oleoso, como pormenorizado no item 3.3.4.

**Tabela 1.** Composição e níveis de garantia da ração comercial adquirida para manejo alimentar dos animais em experimento

COMPOSIÇÃO	NÍVEL DE GARANTIA
Umidade (máx)	120,00g
Proteína bruta (mín)	360,00g
Lisina (mín)	20,00g
Metionina (mín)	6.000,00mg
Treonina (mín)	14,00g
Extrato Etéreo (mín)	80,00g
Fibra Bruta (máx)	60,00g
Matéria Mineral (máx)	150,00g
Cálcio (mín)	10,00g
Cálcio (máx)	30,00g
Fósforo (mín)	6.000,00mg
Prebiótico – MOS (mín)	500,00mg
Ômega 3 (mín)	10,00g
Ômega 6 (mín)	12,00g

Fonte: ALINUTRI NUTRIÇÃO ANIMAL, 2016.

#### 3.2 Obtenção dos animais

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais- CEUA sob o protocolo 057/19. Após previa autorização os animais foram obtidos juntamente com o Setor de Piscicultura ligado ao Departamento de Zootecnia-DZO/UFLA. Os alevinos provenientes de reprodução realizada no setor foram separados e mantidos um tanque de alvenaria com circulação constante de água, em condições de temperatura ambientais, até o desenvolvimento do estágio de juvenis, com aproximadamente 200g de peso vivo.

### **3.3 Delineamento Experimental**

Após obtenção dos animais e crescimento dos mesmos até a fase de juvenis, os peixes foram devidamente transportados para o Biotério Central da UFLA-Ala de Peixes, onde foram separados randomicamente em quatro caixas com capacidade de 500 litros de água cada uma. Os animais foram devidamente transportados e, posteriormente mantidos por 10 dias nos novos sistemas para quarentena clínica e adequação social dos novos grupos, período este que onde a temperatura da água foi mantida em todas as caixas a 21°C.

#### **3.3.1 ENSAIO 1**

Posteriormente a criação, transporte e quarentena os animais foram aclimatados nas devidas temperaturas experimentais, sendo: Tratamento T21°C a uma temperatura de 21°C, T28°C temperatura de 28°C e T32°C a uma temperatura de 32°C, outros parâmetros de qualidade da água foram padronizados, como sistema fechado de recirculação de água com uso de bombas e filtros, padronização de pH, e controle de amônia, em todos os tratamentos. Desta forma objetivou-se a adequação metabólica dos animais ao meio, uma vez que as tilápias apresentam uma faixa de amplitude de conforto térmico muito variada, e podem alterar seu metabolismo para adaptação em diversos meios, com isso foi possível a observação das variações de taxa alimentar em cada grupo para adequação do volume de ração consumida em função da temperatura de manejo.

Após a aclimação dos animais à temperatura, iniciou-se a exposição ao florfenicol nos grupos T21°C, T28°C e T32°C em uma dosagem de 10mg/kg, fornecidos por via oral, adicionados à ração, durante um período de 10 dias consecutivos de tratamento, como preconizado pelo fabricante. Durante o tratamento nos respectivos grupos experimentais, foram capturados e devidamente eutanasiados três animais de cada tratamento nos dias 1, 6 e 10 sendo coletadas amostras de sangue, musculo, fígado, cérebro, brânquias e gônadas para posterior determinação das concentrações de fármaco nestes tecidos, onde poderá ser avaliando a curva farmacocinética e determinar possíveis variações terapêuticas em resposta as alterações térmicas de tratamento. Após os 10 dias de tratamento recomendados pelo fabricante (MSD Saúde animal) os demais animais dos tratamentos T21°C, T28°C e T32°C foram abatidos nos dias 5, 10, 15 e 20, contados após o termino do tratamento, e

posteriormente eviscerados e filetados para coleta das amostras e realização das avaliações de resíduos na musculatura e características do file.

### **3.3.2 ENSAIO 2**

Um quarto grupo experimental (T14°C) foi ainda submetido à temperatura de 14°C e também aclimatado a esta temperatura por igual período dos demais tratamentos do Estudo 1. Porém, neste grupo (T14°C), após período de aclimação foi constatado a interrupção total voluntária de alimentação pelos animais. Assim estes foram submetidos ao tratamento por via de administração diferente, sendo optado pelo banho de imersão com florfenicol a uma concentração de 500ppm e posteriormente diminuindo-se a concentração a 200ppm por 5 dias de tratamento, e mantidos a temperatura de 14°C.

Durante o tratamento nove animais foram capturados e devidamente eutanasiados nos tempos de 1h, 3hs, 6hs, 12hs e 120hs (5 dias) após o início da imersão para coletas de amostras e determinação da curva farmacocinética durante o tratamento. Após exposição os demais animais foram eutanasiados nos dias 5, 10, 15 e 20 para avaliação de resíduos nos filés e no fígado, parâmetros avaliados nos departamentos de Química (DQI) e de Medicina Veterinária (DMV) da UFLA.

Foram ainda, coletadas amostras de sangue durante o período experimental, na fase de tratamento para determinação farmacocinética e posteriormente para verificação da depleção em ambos os estudos. Para isso os animais de todos os tratamentos no Estudo 1 e 2 (T14°C, T21°C, T28°C e T32°C) foram retirados cuidadosamente nos devidos tempos das caixas d'água com o auxílio de puçá e panos umedecidos para evitar ao máximo o estresse e possibilitar a coleta de sangue, em seguida foram imersos em aquário contendo solução de água e eugenol para insensibilização por aprofundamento anestésico e posterior eutanásia por secção medular (como preconizado pela resolução 1000 do CFMV) e coleta dos demais materiais biológicos (músculo, fígado, cérebro, gônadas e brânquias). O procedimento foi realizado o quanto breve possível para evitar o estresse nos animais e as amostras de sangue foram coletas por punção cardíaca utilizando seringas de 3,0 ml com EDTA.

### 3.3.3 ENSAIO 3

A partir dos dados já publicados sobre concentração plasmática de florfenicol, foi criado um modelo farmacocinético em tilápias. O estudo utilizado como embasamento foi o realizado por RAIKAT et al. (2019), onde foi determinada a concentração plasmática após a administração única de florfenicol por gavagem nas doses de 10, 15, 30, 45 mg/kg, nas temperaturas de 24, 28 e 32°C em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Primeiramente, os dados foram extraídos a partir das correspondentes figuras utilizando-se o programa GetData Graph Digitizer® e tabulados no Microsoft Excel® para, posteriormente, realizar as análises de farmacometria utilizando o programa Monolix 2020 da Lixoft®.

O ajuste dos dados foi verificado frente a diversos modelos de farmacocinética plasmática nos quesitos absorção, com ou sem *delay*, de primeira ordem ou ordem zero; distribuição, em um, dois ou três compartimentos e por fim, eliminação, podendo ser linear ou de Michaelis-Menten. As temperaturas foram incluídas no modelo como covariável quantitativa contínua. A verificação do melhor ajuste foi realizada mediante as análises gráficas. (FOURCOT et al., 2020).

Finalmente, foi realizada a simulação de um estudo farmacocinético para avaliar a dose de 10mg/kg como indicado em bula no produto comercial Aquaflor® MSD e as doses extra bula de 15 e 20 mg/kg, estas dosagens foram administradas a cada 24h durante 10 dias de tratamento. Cada regime de dose foi avaliado nas temperaturas de 18, 21, 26 e 30°C utilizando 12 animais por grupo, através do programa Simulx 2020 da Lixoft®.

### 3.3.4 Elaboração da ração medicamentosa com adição de florfenicol

Para o preparo das rações com medicamento foram empregadas metodologias usualmente utilizadas, como indicado pelo fabricante do medicamento veterinário, onde foi realizada uma diluição previa do fármaco em óleo (solubilizando o mesmo e evitando a lixiviação na água) e posteriormente homogeneizado na ração para fornecimento aos animais.

### **3.3.5 Elaboração do banho de imersão com Florfenicol**

Para o preparo do banho de imersão medicamentoso foi utilizado o medicamento na apresentação líquida para aplicação injetável. Este foi homogeneizado em água através de agitador laboratorial, sendo esta diluição homogeneia incorporada na caixa do grupo T14°C na concentração inicial de 500ppm, e posteriormente reduzida para 200ppm em dose de manutenção através da diluição com a incorporação de água no sistema, seguindo os cálculos necessários.

### **3.4 Oxidação (T-Bars)**

Os files obtidos no abate e na filetagem das carcaças foram submetidos à avaliação do perfil de oxidação lipídica para análise da estabilidade lipídica dos mesmos, através do teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), com avaliação nos dias 1 e 90 após abate. A determinação dos valores foram realizadas em duplicata conforme KANG, CHERIAN & SIM (2001).

Após o período de tratamento dos animais, os mesmos foram abatidos nos dias 0, 5, 10, 15 e 20 contados a partir do fim do tratamento com antibiótico. Neste interim foram coletados os filés provenientes das carcaças dos animais, juntamente com as demais amostras, sendo os filés submetidos a análises de T-bars para determinação da oxidação lipídica. As análises de T-bars ocorreram um dia imediatamente após o abate e posteriormente com 90 dias de armazenamento em freezer a -20°C, respectivamente em todos os tempos de abate (0, 5, 10, 15 e 20 dias).

Os resultados foram avaliados através das análises ANOVA de duas vias, uma vez que era desejado observar a interferência das diferentes concentrações (observadas pela depleção ao longo do tempo), bem como a interferência das temperaturas dos tratamentos, conseqüentemente influenciando também as concentrações do fármaco no organismo dos animais. Aliando assim estas variáveis podemos presumir a interferência do florfenicol na oxidação lipídica da carne, sendo este um importante fator de determinação do tempo de prateleira dos produtos (OSAWA et al, 2005).

### **3.5 Análise dos dados**

Os dados coletados foram submetidos a testes de normalidade, verificada através do teste de Shapiro-Will e posteriormente submetidos à ANOVA pelo programa software GraphPad Prisma. Foi realizado teste de duas amostras relacionadas (duas vias) e o teste T.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Manejo Terapêutico (Ensaio 1 e 2)**

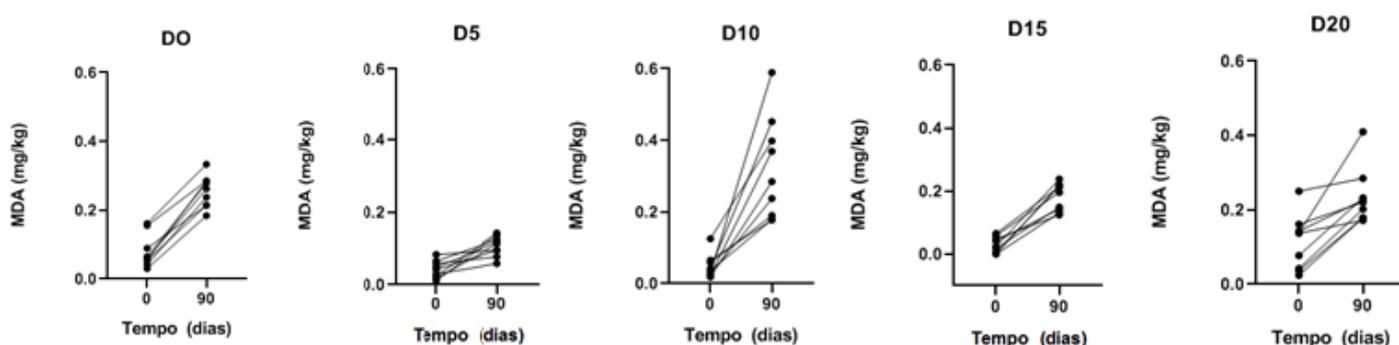
Como observado os tratamentos T21°C, T28°C e T32°C que foram mantidos em temperaturas de 21°C, 28°C e 32°C respectivamente, mantiveram seu consumo alimentar, mesmo que com algumas variações de consumo. Assim o tratamento via oral dos planteis infectados se mostra efetivo em condições de manejo onde a temperatura da água esta em torno de temperaturas acima de 21°C.

Em condições de temperaturas mais frias, como observada em grande parte do ano em grandes regiões produtoras, os animais estão mais vulneráveis a infecções e doenças popularmente conhecidas como doenças de inverno. Somando-se a isso o metabolismo destes animais a estas condições encontra-se em estado letárgico, onde muitas vezes os peixes interrompem de maneira voluntária o consumo de alimentos por determinados períodos de frio intenso, o que inviabiliza o tratamento de infecções bacterianas pelo fornecimento de ração medicamentosa. Assim a busca por vias alternativas de administração de medicamentos deve ser considerada em condições que possibilitem o seu uso seguro. O tratamento T14°C evidenciou a necessidade e possibilidade de vias alternativas de tratamento, como o banho de imersão, necessário para atender a interrupção do consumo alimentar neste grupo, uma vez que não houve consumo de ração, porém os animais puderam ser tratados via banho de imersão.

## 4.2 Oxidação Lipídica/Shelf Live (Ensaio 1)

Na primeira avaliação de T-bars imediatamente após o abate, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos T21°C, T28°C e T32°C, nem entre os diferentes dias de abate (0, 5, 10, 15 e 20). A segunda avaliação de T-bars realizada com 90 dias de armazenamento indicou que houve aumento de oxidação em todos os grupos avaliados (Figura 5).

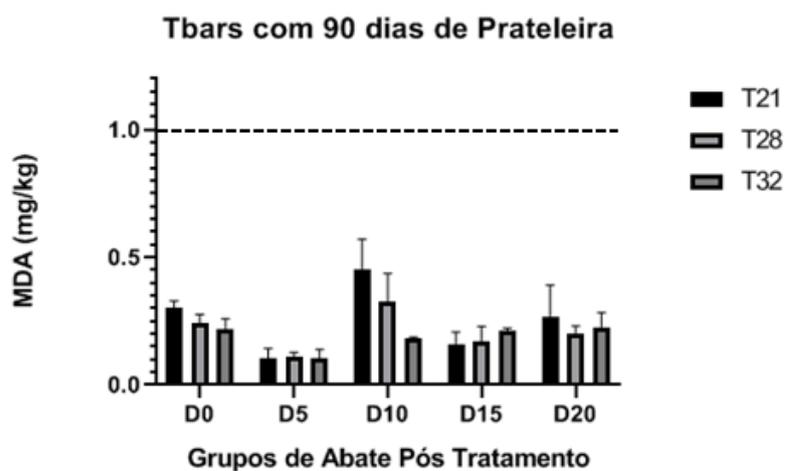
**Figura 5** - Valores iniciais e após armazenamento a -20°C por 90 dias de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico, expressado em mg de Malonaldeído (MDA) por kg de músculo de tilápias (*Oreochromis niloticus*) tratadas com florfenicol (10 mg/kg), via oral, durante 10 dias, abatidas em diferentes tempos após tratamento.



Fonte: Do Autor (2021)

Todos os filés avaliados sofreram oxidação após armazenamento de 90 dias. O aumento de oxidação observado, entretanto, não foi maior do que os valores considerados como indicativo de deterioração para pescados (OSAWA et al, 2010), (MONTEIRO et al, 2012), mesmo após 90 dias de armazenamento como observado na Figura 6.

**Figura 6** - Valores de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico, expressado em mg de Malonaldeído (MDA) por kg de músculo de tilápias (*Oreochromis niloticus*) criadas a 21°C, 28°C e 32°C, tratadas com florfenicol (10 mg/kg), via oral, durante 10 dias, abatidas em diferentes tempos após tratamento e armazenadas a -20°C por 90 dias. Linha tracejada indicando valor considerado crítico de deterioração do pescado (1mg/kg de MDA)

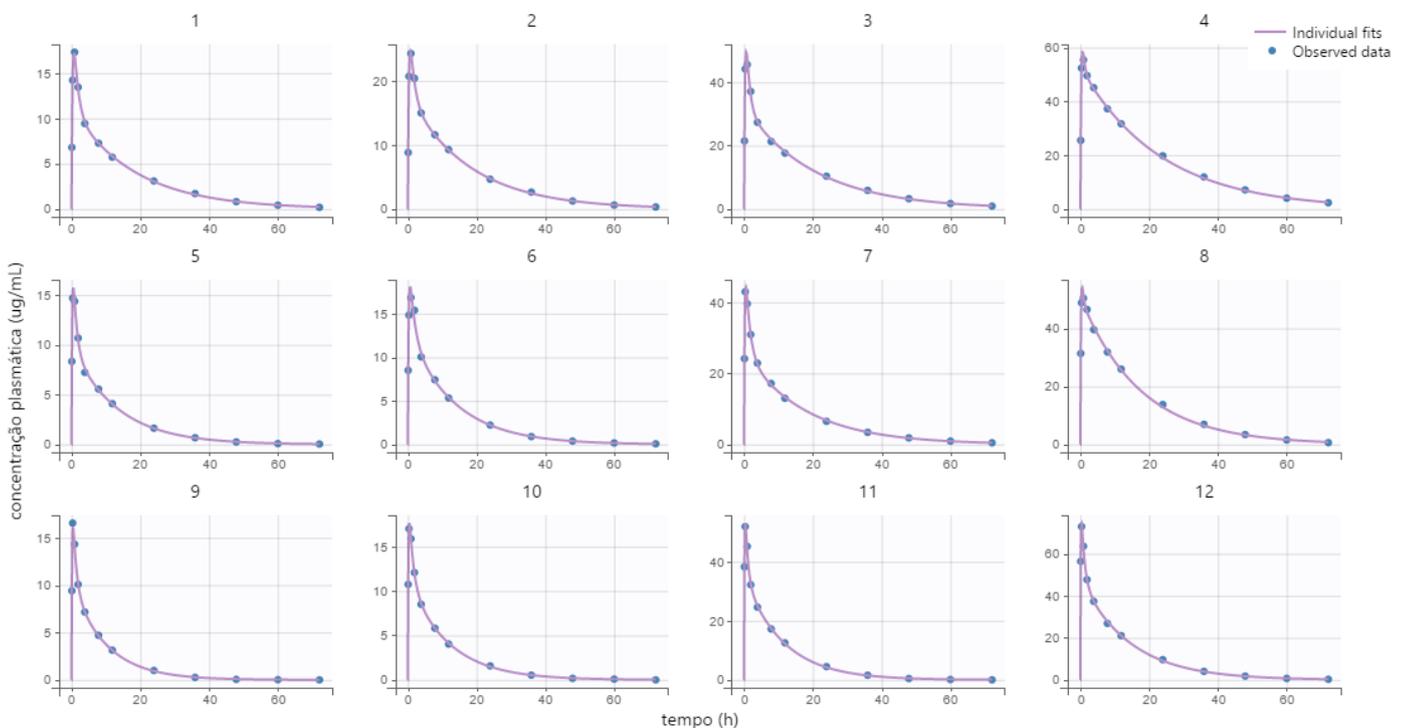


Fonte: Do Autor (2021).

## 4.2 Modelamento Farmacocinético (Ensaio 3)

O melhor modelo farmacocinético estabelecido foi de absorção de primeira ordem desde a via extravascular e com *delay*, a distribuição foi em dois compartimentos e com eliminação linear RAIAT et al (2019) determinaram a concentração plasmática após a administração única de florfenicol por gavagem nas doses de 10, 15, 30, 45 mg/kg, nas temperaturas de 24, 28 e 32°C em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), na Figura 7 pode-se observar os valores médios nos diferentes grupos do referido estudo. Concomitantemente pode-se verificar mediante a curva dos valores médios preditos que o modelo descreve adequadamente aos valores médios observados em todas as doses e temperaturas avaliadas.

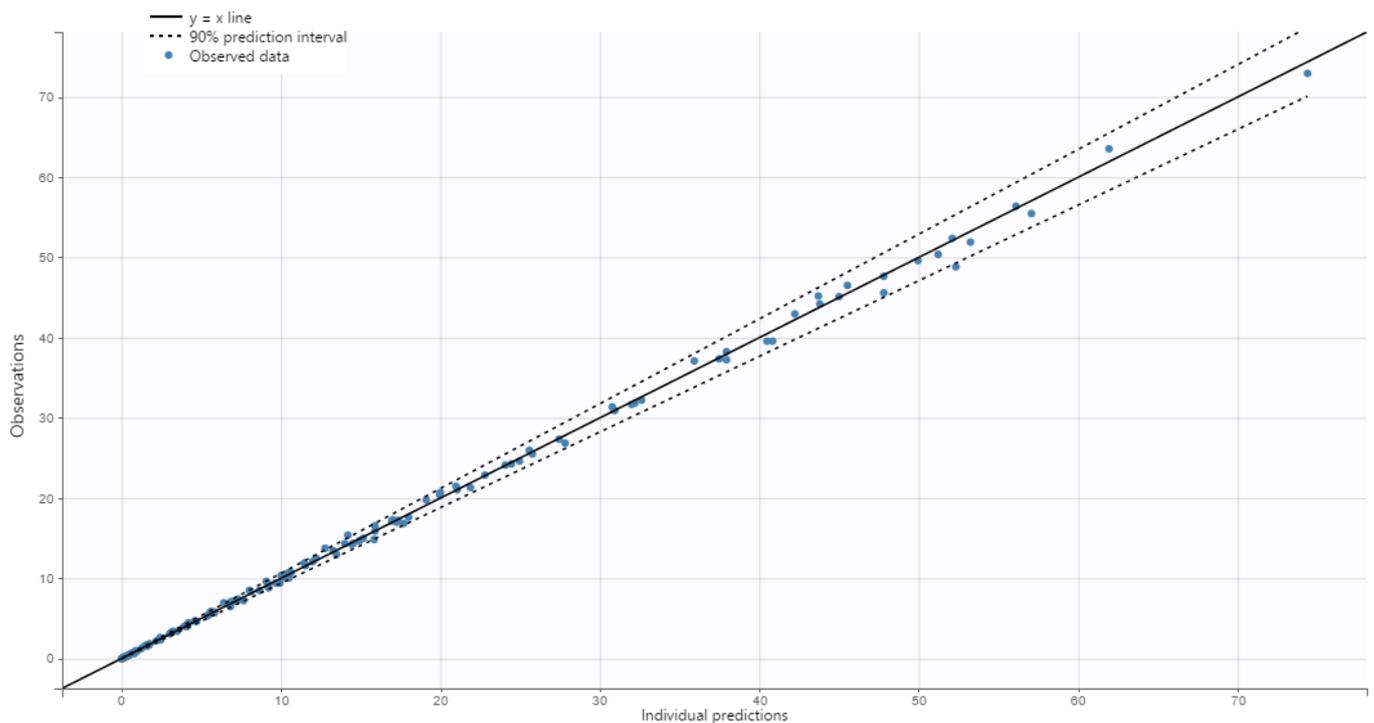
**Figura 7** – Valores médios de concentração plasmática de florfenicol observados (pontos azuis) nos grupos experimentais do estudo de farmacocinética em tilápias do Nilo realizado de RAIAT et al (2019) e valores médios preditos pelo modelo construído (linha contínua).



**Fonte:** Do Autor, (2021).

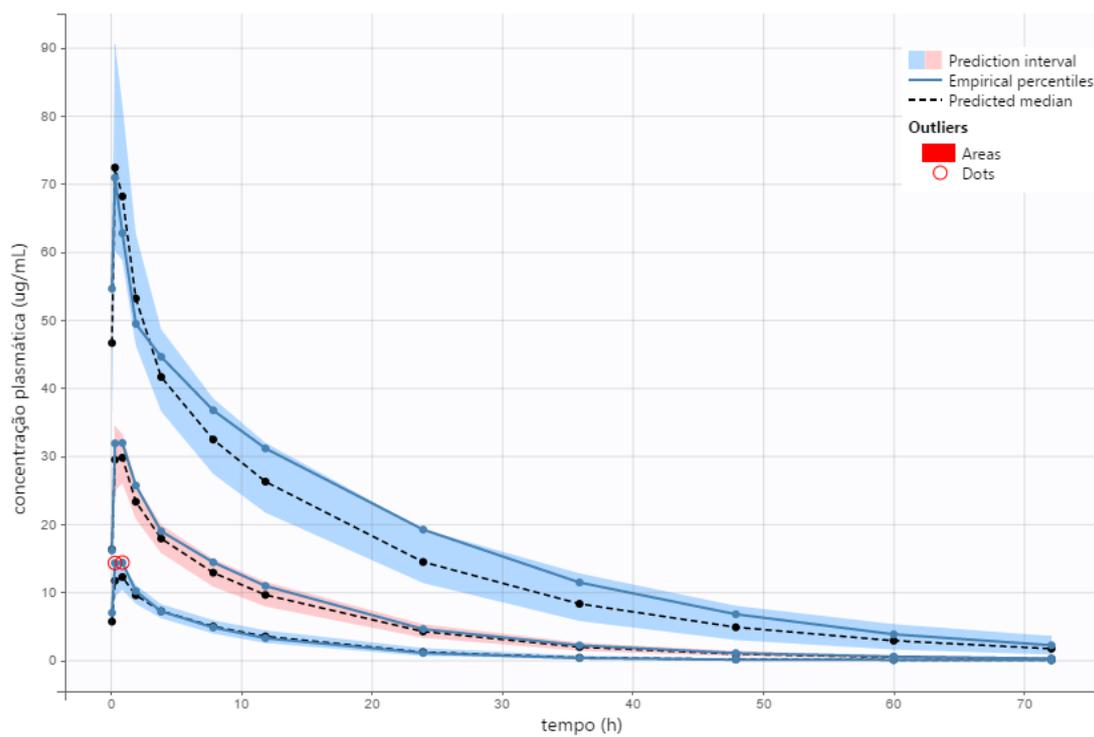
Este modelo apresentou uma adequada correlação entre os valores observados e preditos como mostrado na Figura 8, em que se observa que os valores observados apresentam a dispersão homogênea a respeito da linha de valores preditos, e dentro do intervalo de 95% dos valores preditos. Na Figura 9 pode-se observar que as curvas dos valores de concentração plasmática observados e preditos apresentam alto grau de correspondência. Além disso, os valores observados encontram-se dentro da faixa de variação do intervalo de 95% de confiança.

**Figura 8:** Valores de concentração plasmática de florfenicol observados (pontos azuis) e preditos (linha preta). A linha de pontos indica o intervalo de confiança de 95% dos valores preditos.



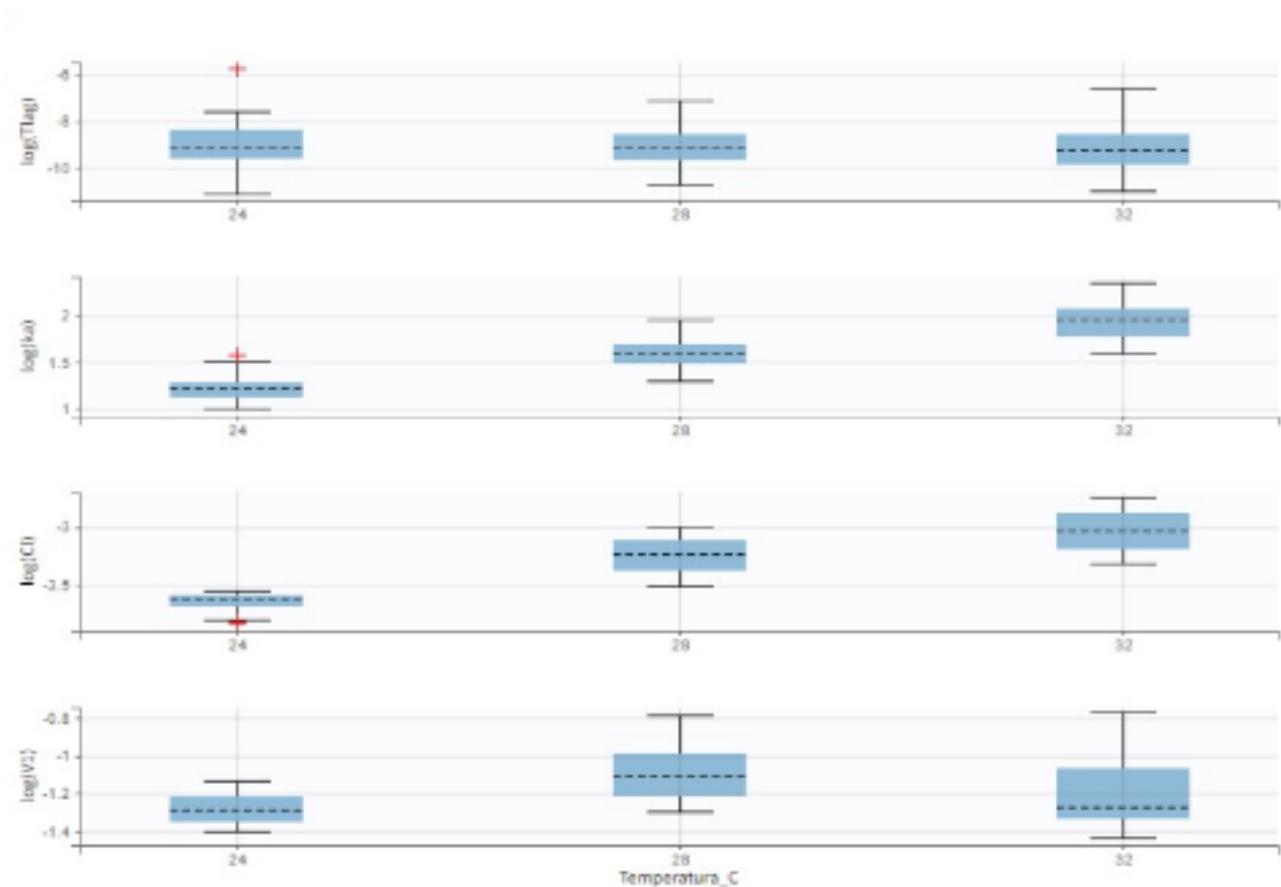
**Fonte:** Do Autor, (2021).

**Figura 9:** Mediana, percentil 5 e percentil 95 dos valores observados (linha contínua azul, e preditos linhas descontinua preta) da concentração plasmática de florfenicol em tilápia. As sombras indicam o intervalo de 95% de confiança dos valores preditos.



**Fonte:** Do Autor, (2021).

**Figura 10-** Caixa de bigodes do tempo de latência de absorção (Tlag), constante de absorção (Ka), depuramento (Cl) e volume de compartimento 1 (V1) de florfenicol em tilápia segundo as temperaturas de 24°C, 28°C e 32°C.



**Fonte:** Do Autor, (2021).

Os parâmetros de tempo de latência de absorção (Tlag), constante de absorção (Ka), depuramento (Cl) são influenciados pelas temperaturas de criação, ao passo que o volume de compartimento central (V1) não foi influenciado (Figura 10).

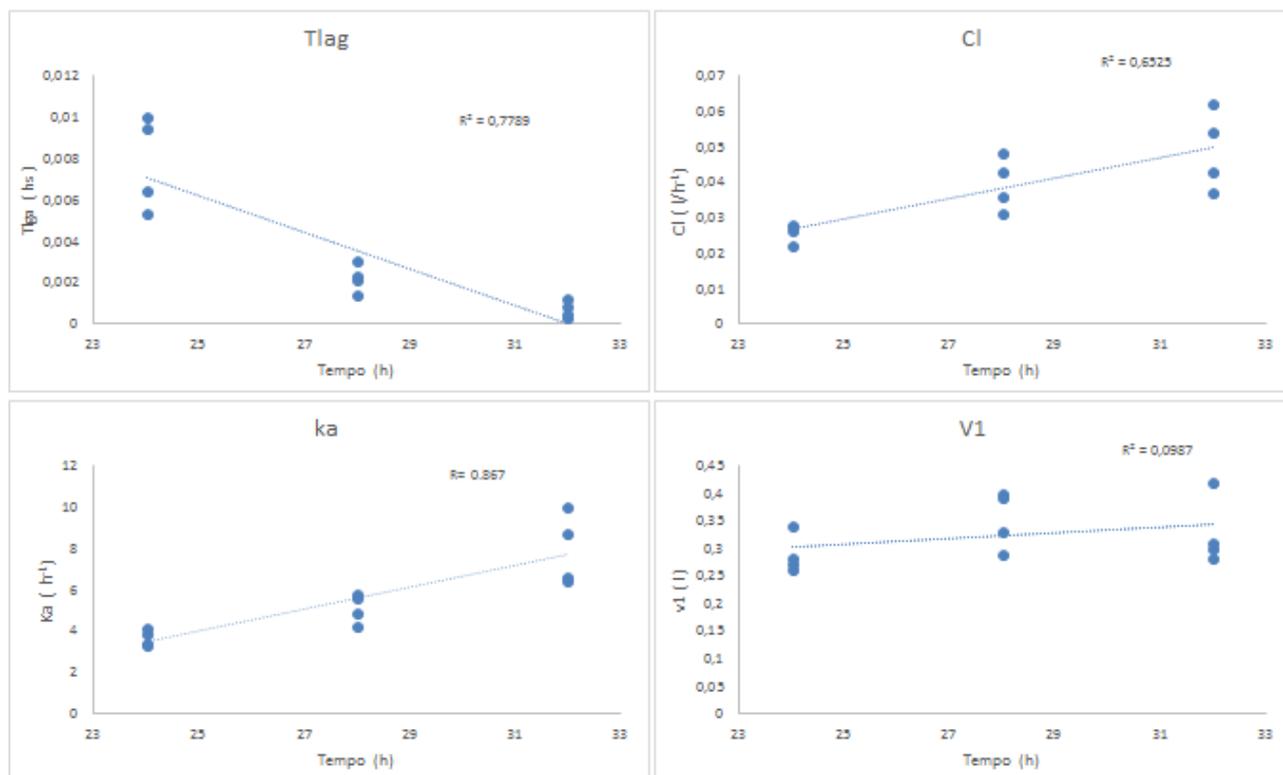
Os animais mantidos à temperatura mais elevada apresentaram Tlag menor em relação aos que foram mantidos em temperaturas mais baixas (R=0,882) (Figura 11 e

12). O tempo lag corresponde ao tempo que o fármaco demora para ser liberado desde a ração até a fase aquosa do conteúdo intestinal (AYDIN, 2020). A liberação do fármaco desde a forma farmacêutica é controlada segundo a temperatura do sistema (AYDIN, 2020). Portanto, a diminuição do Tlag pode corresponder à uma maior velocidade de liberação em temperaturas mais elevadas.

A constante de absorção ( $K_a$ ) apresentou correlação positiva com o aumento da temperatura ( $R=0,867$ ) (Figura 11 e 12). Esta constante representa a velocidade do processo de absorção que implica na passagem do fármaco desde a luz intestinal até a circulação sistêmica (LEN & WONG, 2017). Este processo é dependente da circulação sanguínea no trato gastro-intestinal e da taxa metabólica geral do animal (TOUTAIN et al., 2004) de processo de absorção de fármacos. Os animais poiquilotérmicos, como a tilápia, alteram de forma diretamente proporcional a taxa metabólica geral e o débito cardíaco em função da temperatura em que estão submetidas, como forma de adaptação ao meio (ZENI et al., 2016). Isso poderia explicar porque em baixas temperaturas de criação foram observados menores constantes de absorção.

O depuramento ( $Cl$ ) apresentou uma correlação positiva em relação à temperatura, sendo observado uma queda em condições de temperaturas mais baixas ( $R=0,807$ ) (Figura 11 e 12). O depuramento é o parâmetro que representa a eliminação do fármaco do organismo, incluindo-se o componente hepático e renal (TOUTAIN et al., 2004). Estudos realizados em peixes demonstraram que o metabolismo hepático e eliminação renal são diminuídos com as baixas temperaturas (ZENI et al., 2016). Assim os menores valores de depuração observados em tilápias criadas em temperaturas mais baixas seriam determinados pelas menores taxas de metabolismo hepático e eliminação renal.

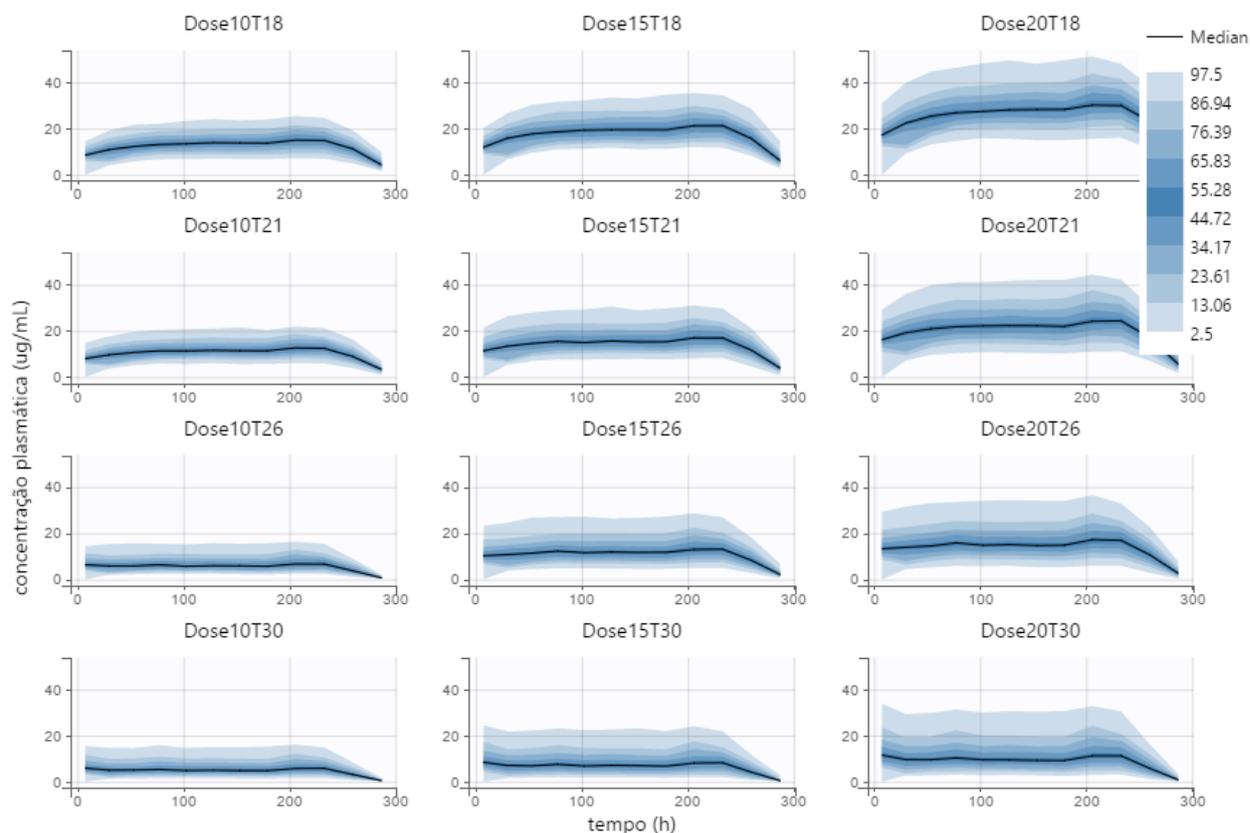
**Figura 11-** Correlação do tempo de latência de absorção (Tlag), constante de absorção (Ka), volume do compartimento 1 (V1) e depuração (Cl) de florfenicol em tilápia com as temperaturas de 24°C, 28°C e 32°C (n= 12).



**Fonte:** Do Autor, (2021).

A Figura 12 demonstra a variação das médias moveis de concentração plasmática ao longo de tempo segundo as doses e a temperatura. Pode-se observar como animais mantidos a 30° C apresentam uma mediana da concentração plasmática móvel de aproximadamente metade do que os animais criados a 18° C e tratados nas diferentes doses avaliadas. Por outro lado, o aumento das doses determinou o aumento de aproximadamente o dobro das médias moveis de concentração plasmáticas.

**Figura 12** – Simulação das médias móveis das concentrações plasmáticas de florfenicol após a administração por gavagem de 10, 15 e 20 mg/kg a cada 24hs durante 10 dias em tilápias de Nilo, criadas à 18°C, 21°C, 26°C e 32°C (n=1000).

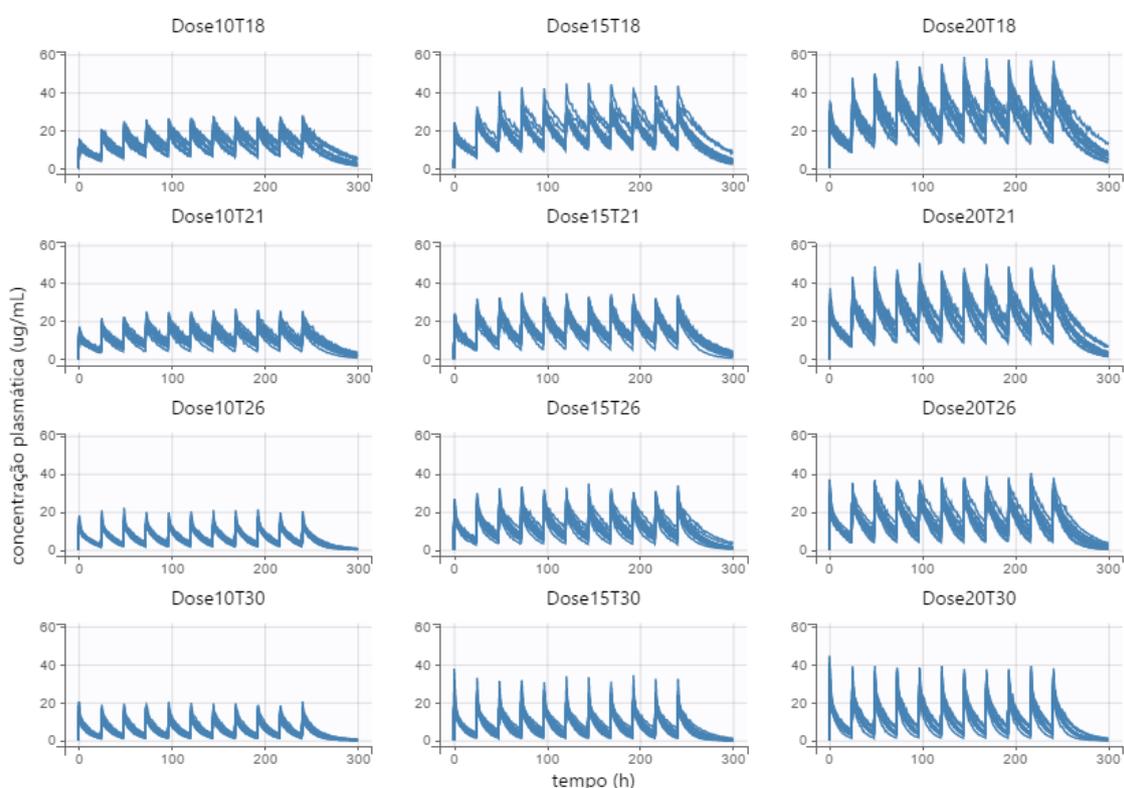


**Fonte:** Do Autor, (2021).

Na Figura 13 pode-se observar que o modelo permitiu quantificar a influencia da temperatura nas concentrações plasmáticas e estimar as concentrações correspondentes à temperaturas distintas das observadas por RAIRAT et al., (2019). O sucesso terapêutico do florfenicol é determinado pelas adequadas concentração plasmática ao longo do tempo (TOUTAIN et al., 2021). Por outro lado, concentrações excessivas de florfenicol prolongadas durante o tempo provocam saturação do metabolismo com conseqüente dano hepático (CARRASCHI et al., 2018), portanto o modelo permitirá o

ajuste dos intervalos de doses, o que pode possibilitar melhor tolerância, evitando a saturação metabólica. No Brasil as temperaturas de criação em que estão submetidos os animais variam em função das regiões e dentro delas em função das diferentes épocas do ano (CASAROLI et al., 2018). Portanto, o modelo proposto neste trabalho permite o ajuste de doses específicas em função da temperatura para cada região de criação e de suas variações climáticas ao longo do ano.

**Figura 13** – Simulação das concentrações plasmáticas de florfenicol após a administração por gavagem de 10, 15 e 20 mg/Kg a cada 24hs durante 10 dias em tilápias de Nilo, criadas à 18°C, 21°C, 26°C e 32°C (n=12).



Fonte: Do Autor, (2021).

O modelo possibilita a determinação do perfil de concentração plasmática em função da dose administrada e da temperatura de criação. Assim, a associação do modelo com um modelamento PK/PD permitirá estabelecer a eficácia terapêutica em função de CIM da bactéria que esta acometendo o plantel. (TOUTAIN et al, 2021). No Brasil, já foi demonstrado uma variabilidade de suscetibilidade de *Streptococcus agalactiae* observadas por MIC que variam de 0,125 a 16 µg/ml de florfenicol (DE

OLIVEIRA et al, 2018), (GOZI, 2016), e MIC's de 0,125 a 4 µg/ml de florfenicol para *Aeromonas spp.* (GODOY et al, 2008), (GOZI, 2016). O conceito de medicina de precisão aplicada na produção animal implica ainda na administração de doses corretas, para o lote correto, no momento e período correto. Portanto o modelamento proposto permitiria o cálculo de doses para um tratamento assertivo considerando variáveis de temperatura de criação e suscetibilidade da cepa infectante.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Diante dos desafios e dificuldades enfrentados a campo frente as mudanças térmicas durante os períodos de criação, surge a necessidade de adequação de manejos terapêuticos em condições ambientais distintas. Apesar da grande prevalência de medicamentos veterinários destinados ao tratamento de peixes serem por administração via oral adicionada à ração, evidencia-se que esta via de administração é realmente mais prática, apresenta grande eficácia para o tratamento do plantel e exige manejos mais simplificados. Porém esta via de administração se mostra eficiente apenas em condições onde os animais apresentam condições metabólicas mais elevadas, onde apesar de infectados ainda buscam voluntariamente a alimentação fornecida, o que se aplica em tratamentos com temperaturas mais elevadas.

Este trabalho embasa projetos futuros, para determinação de concentrações plasmáticas e teciduais dos animais tratados em diversas temperaturas, possibilitando a continuidade de estudos de otimização dos regimes de doses.

## 6 CONCLUSÕES

Mudanças na temperatura de criação dos animais interferem de forma intensa no comportamento e consumo alimentar das tilápias (*Oreochromis niloticus*). Portanto as diferentes temperaturas de manejo e criação dos animais demandam a necessidade de pesquisas de outras vias de administração alternativas à via oral dos fármacos, em animais potencialmente infectados.

A temperatura de criação dos animais tratados com florfenicol e o tempo em que foram abatidos demonstraram não interferir nos parâmetros de Tbars da musculatura armazenada a -20°C.

O modelo farmacocinético proposto por este trabalho cumpriu com os requisitos de qualidade, permitindo quantificar o impacto da temperatura nos parâmetros farmacocinéticos, ademais permitiu estimar as concentrações plasmáticas de florfenicol para tilápias em diferentes temperaturas de criação. Portanto o modelo se mostrou uma ferramenta promissora para os ajustes de doses necessárias para otimização dos tratamentos nas diferentes regiões e climas.

### 3 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALAFIATAYO, A. A; LAI, K. S; SYAHIDA, A; MAHMOOD, M; SHAHARUDDIN, N. A. Akinola Adekoya et al. Phytochemical evaluation, embryotoxicity, and teratogenic effects of Curcuma longa extract on zebrafish (*Danio rerio*). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

ALAK G, PARLAK V, YELTEKIN AÇ, UCAR A, ÇOMAKLI S, TOPAL A, ATAMANALP M, ÖZKARACA M, TÜRKEZ H. The protective effect exerted by dietary borax on toxicity metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 216, p. 82-92, 2019.

ALAK, Gonca et al. The protective effect exerted by dietary borax on toxicity metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 216, p. 82-92, 2019.

AYDIN, N. E. Effect of Temperature on Drug Release: Production of 5-FU-Encapsulated Hydroxyapatite-Gelatin Polymer Composites via Spray Drying and Analysis of In Vitro Kinetics, **International Journal of Polymer Science**, v. 2020, p. 1-13, 2020.

BARCELLOS, LEONARDO JOSÉ GIL; SOUSA, SILVIA MARIA GUIMARÃES DE; WOEHL, VIVIANE MARA. Stress in fish: physiology of the stress-response, causes and consequences (review). **Boletim do Instituto de Pesca**, [S.l.], v. 26, n. 1, p. 99-111, oct. 2000. ISSN 1678-2305. 2020.

BARCELLOS, LEONARDO JOSÉ GIL; SOUSA, SILVIA MARIA GUIMARÃES DE; WOEHL, VIVIANE MARA. Stress in fish: physiology of the stress-response, causes and consequences (review). **Boletim do Instituto de Pesca**, [S.l.], v. 26, n. 1, p. 99-111, oct. 2000.

BARROSO, R. M.; MUÑOZ, A. E. P.; TAHIM, E. F.; TENÓRIO, R. A.; MUEHLMANN, L. D.; SILVA, F. M.; BARRETTO, L. E. G. de S.; HEIN, G.; CARMO, F. J.; FLORES, R. M. V. Dimensão socioeconômica da tipicultura no

Brasil. **EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Brasília, DF, 2018.

BOOTHE, D. M. Small Animal Clinical Pharmacology and Therapeutics 2nd Edition. **Published Date:** 5th April 2011.

BRASIL. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, de coelho, de aves e de avestruz, de leite, pescado, mel e ovos. Instrução Normativa nº 5 de 23 de Abril de 2019.

BRASIL. Resolução RDC 12, Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA**. Brasília, Jan. 2001.

CAIN, D., CIDLOWSKI, J. Immune regulation by glucocorticoids. **Nat Rev Immunol** **17**, 233–247 (2017).

CARRASCHI, S., SHIOGIRI, N., VENTURINI, F., CRUZ, C., GÍRIO, A., & MACHADO NETO, J. Acute toxicity and environmental risk of oxytetracycline and florfenicol antibiotics to pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 2, p. 115-122, 2018.

CASAROLI, Derblai et al . APTIDÃO EDAFOCLIMÁTICA PARA O MOGNO-AFRICANO NO BRASIL. **Ciênc. Florest.**, Santa Maria , v. 28, n. 1, p. 357-368, Mar. 2018.

CASAROLI, Derblai et al. Aptidão edafoclimática para o mogno-africano no Brasil. **Ciência Florestal**, v. 28, p. 357-368, 2018.

CHEN, J.; YING, G.G.; DENG, W.J. Antibiotic Residues in Food: Extraction, Analysis, and Human Health Concerns. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.67, p. 7569-7586, 2019.

COTRIM, W. S. Efeitos da condição térmica de criação e de antibióticos na dieta sobre o desempenho e a qualidade da carne de frangos de corte. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, 2010.

DE OLIVEIRA, T. F, QUEIROS, G. A, TEIXEIRA, J. P, FIGUEIREDO, H. C. P, LEAL, C. A. G. Recurrent *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) treated with florfenicol. **Aquaculture**, 493, 51-60. 2018

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome, Italy, 2018. Disponível em <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf> Acesso em 23/09/2018.

FERRANTE M, RUBIM FM, PAULA DAJ, MACHADO GJ, GUIMARAES JPF, MURGAS LDS (2020). Evaluation of the florfenicol treatment of infections caused by *streptococcus spp* and *aeromonas spp* in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Adv. Anim. Vet. Sci.** 8(6): 624-628. 2020

FOURCOT, A. et al. Modeling chlordecone toxicokinetics data in growing pigs using a nonlinear mixed-effects approach. **Chemosphere**, v. 250, p. 126151, 2020.

GÁLVEZ, F. L. A.; BLACIO, M. V. F.; QUINCHE, Á. R. S.; SAAVEDRA, M. L. Z. Determinación de residuos de tetraciclinas en muestras de carne bovina destinadas al consumo humano. **Revista de Las Agrocencias.** v. 20, p. 67-78, 2018.

GATTI JUNIOR, P.; ASSUNÇÃO, A. W. A.; BALDIN, J. C.; AMARAL L. A. Microbiological quality of whole and filleted shelf-tilapia. **Aquaculture.** v. 433, p. 196-200.

GODOY, D. T; MIAN, G. F; ZANOLO, R; YUHARA, T. Y; FARIA, F. C; FIGUEIREDO, H. C. Patterns of resistance to florfenicol and bicyclomycin in Brazilian strains of motile aeromonads. **Aquaculture**, 285, 255-259. 2008.

GOZI. Perfil de resistência à antimicrobianos de *Aeromonas sp.* e *Streptococcus sp.* isolados de tilápia-do-Nilo e detecção dos genes envolvidos na resistência à tetraciclina. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP. Repositório Unesp 2016.

GUERRERO, JULIA. Understanding cortisol action in acute inflammation: A view from the adrenal gland to the target cell. **Rev. méd. Chile**, Santiago , v. 145, n. 2, p. 230-239, feb. 2017.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal. Rio de Janeiro, v. 44, p.1-51, 2016.

INTORRE, L.; CECCHINI, S.; BERTINI, S.; COGNETTI VARRIALE, A. M.; SOLDANI, G.; MENGOZZI, G. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass. **Aquaculture.** n.182, p. 49-59, 2000.

KAATTARI, S.L., TRIPP, R.A. (1987). Cellular mechanisms of glucocorticoid immunosuppression in salmon. **J. Fish Biol.** 31 (Suppl. A): 129-132.

KUBTIZA, F. Demandas para produção sustentável de tilápias. **Panorama da aquicultura**, v. 23, n. 138, jul/ago 2013.

LEIRA, M. H. ; LAGO, A. de A. ; BOTELHO, H. A.; MELO, C. C. V. ; MENDONÇA, F. G. ; NASCIMENTO, A. F. ; FREITAS, R. T. F. Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil – uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública.** v. 3, n. 1, p. 044-059, 2016.

LEN & CHEN . Bayesian population physiologically-based pharmacokinetic model for robustness evaluation of withdrawal time in tilapia aquaculture administrated to florfenicol. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Volume 210, 1, 111867 March 2021.

LEONEL, A.P.S. Temperatura da água em cultivos de tilápia em viveiros escavado. Dissertação (mestrado em zootecnia)- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2011.

LEWBART, G., VADEN, S., DEEN, J., MANAUGH, C., WHITT, D., DOI, A., FLAMMER, K. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the red pacu (*Colossoma brachypomum*) after intramuscular, oral and bath administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 20(2), 124–128.1997

LIN, L; WONG H. Predicting Oral Drug Absorption: Mini Review on Physiologically-Based Pharmacokinetic Models. **Pharmaceutics**. 9(4):41, 2017

LLOYD DH, PAGE SW. 2018. Antimicrobial stewardship in veterinary medicine. **Microbiol Spectrum** 6(3): ARBA-0023-2017.

ROCHA LOURES, B. T. R.; RIBEIRO, R. P.; VARGAS, L.; MOREIRA, H. L. M.; SUSSEL, F. R.; POVH, J. A.; CAVICHIOLO, F. Manejo alimentar de alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), associado às variáveis físicas, químicas e biológicas do ambiente. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 23, p. 877-883, 9 maio 2008.

MONTEIRO, M. L.G; MARSICO, E. T; TEIXEIRA, C, E; MANO, S. B; JUNIOR, C. A. C; VITAL, H. C. Validade comercial de filés de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) resfriados embalados em atmosfera modificada e irradiados. **Ciência Rural**. v. 42, n. 4, 2012.

MONTEIRO, S. H.; GARCIA, F; GOZI, K. S; ROMERA, D. M; FRANCISCO, J. G; GRAZIELA C. R. MOURA-ANDRADE & VALDEMAR L. TORNISIELO. Relationship between antibiotic residues and occurrence of resistant bacteria in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in cage-farm. P. 817-823, V. 01, Mar 2016.

MOURA, G. S. , OLIVEIRA M. G. A; LANNA E. T. A.; JÚNIOR A. M; MACIEL C. M. R. R. Desempenho e atividade de amilase em tilápias-do-nilo submetidas a diferentes temperaturas. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, n.11, p.1609-1615, nov. 2007.

OSAWA, C. C., FELÍCIO, P. E; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, pp. 655-663. 2005

PRZEPIURA, T. C. A; SANTOS T. HERRERIAS, P.K. KANDALSKI, T. ZALESKI, C. MACHADO, M. FORGATI, M.R.D. DE SOUZA, L. DONATTI. Metabolic responses in Antarctic Nototheniidae brains subjected to thermal stress, **Brain Research**, 2018.

RAIRAT T.; KUO Y.S; CHANG C.C; HSIEH C.Y; CHOU C.C. Bath immersion pharmacokinetics of florfenicol in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **J Vet Pharmacol Ther.** v. 43(6):520-526. Nov. 2020.

RAIRAT, T.; HSIEH C.Y.; THONGPIAM W.; CHOU C.C. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling for the determination of optimal dosing regimen of florfenicol in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different water temperatures and antimicrobial susceptibility levels. **Journal of Fish Diseases.** v. 42, p. 1181-1190, 2019.

RAIRAT, T.; HSIEH C.Y.; THONGPIAM W.; CHOU C.C. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling for the determination of optimal dosing regimen of florfenicol in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different water temperatures and antimicrobial susceptibility levels. **Journal of Fish Diseases.** v. 42, p. 1181-1190, 2019.

RAIRAT, T; HSIEH, C.Y; THONGPIAM, W; SUNG, C. H; CHOU, C. C. Temperature-dependent pharmacokinetics of florfenicol in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following single oral and intravenous administration. **Aquaculture.** v. 503, p. 483-488. 2019

RAMOS,A.M.; ALVES, L.; MARENGO, J.A.; DINIZ, F. A. ANUÁRIO CLIMÁTICO DO BRASIL-2018. DOI [10.13140/RG.2.2.10326.70728](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.10326.70728).

SCHERING-PLOUGH. **Aquaflor/Florfenicol**. Technical Monograph for catfish health professionals. Animal Health, 2010a 36p. 2004.

SCHRECK, C.B.; TORT, L. 2016. The Concept of Stress in Fish. In: SCHRECK, C.B.; TORT, L.; FARREL, A.P.; BRAUNER, C.J. **Fish Physiology**. Amsterdam: Elsevier, p.1-34.

SCHULTER, E. P.; VIEIRA FILHO, J. E. R. Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada–IPEA/Texto para discussão. Rio de Janeiro. 2017.

TOMITA, R. Y.; FURLAN, E. F.; NEIVA, C. R. P.; NETO, M. J. L.; MACHADO, T. H. Utilização do ozônio como agente sanitizante no processamento do pescado. In: 16ª Reunión de la Red Panamericana de Inspección, Control de Calidad y Tecnología de productos Pesqueros - IV Simpósio de Controle de Qualidade do pescado (**SIMCOPE**), p. 1-14, 2010.

TOUTAIN, P. L., BOUSQUET-ME'LOU, A. Bioavailability and its assessment. **J. vet. Pharmacol. Therap.**, v. 27, p. 455–466, 2004.

TOUTAIN, P. L., BOUSQUET-ME'LOU, A. Plasma clearance. **J. vet. Pharmacol. Therap.** 27, 415–425, 2004.

TOUTAIN, P. L.; PELLIGAND, L; LEES, P; BOUSQUET-MÉLOU, A; FERRAN, A. A; TURNIDGE, J. D. The pharmacokinetic/pharmacodynamic paradigm for antimicrobial drugs in veterinary medicine: Recent advances and critical appraisal. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 44, n. 2, p. 172-200, 2021.

TOUTAIN, Pierre-Louis et al. The pharmacokinetic/pharmacodynamic paradigm for antimicrobial drugs in veterinary medicine: Recent advances and critical appraisal. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 44, n. 2, p. 172-200, 2021.

TÜRE, M.; TAÇBAŞ, E.; BAYDAN, E.; KUTLU, İ.; ALTUNTAŞ, C.; AYDIN, F. G.; ARSLANBAŞ, E.; TENKEKECI, G, Y. Determination of the muscle residue levels and withdrawal time of florfenicol in healthy and experimentally *Lactococcus garvieae* infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) grown in the Black Sea water. **Aquaculture Research**. v. 50, p. 1964-1972, 2019.

PEIXE BR. Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2020.

USDA. United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service. **Livestock and Poultry:World Markets and Trade**. USA, Outubro de 2020.

WU, F.; YING, Y.; YIN, M.; JIANG, Y.; WU, C.; QIAN, C.; CHEN, Q.; SHEN, K.; CHENG, C.; ZHU, L.; LI, K.; XU, T.; BAO, Q.; LU, J. Molecular Characterization of a Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain R46 Isolated from a Rabbit. **International Journal of Genomics**. v. 2019, p. 1-12, 2019.

YANG, Y.; YANG, J.; SHANG, D.; LI, F.; WANG, L.; LI, F.; LI, Y.; SUN, Y.; HE, S.; WU, J. Tissue distribution and elimination features of florfenicol in hybrid sturgeon cultured in cool water. **Jounal of Veterinary Pharmcology and Therapeutics**. v. 41, p. 894-901, 2018.

YANG, Y.; YANG, J.; SHANG, D.; LI, F.; WANG, L.; LI, F.; LI, Y.; SUN, Y.; HE, S.; WU, J. Tissue distribution and elimination features of florfenicol in hybrid sturgeon cultured in cool water. **Jounal of Veterinary Pharmcology and Therapeutics**. v. 41, p. 894-901, 2018.

ZENI, T. O.; OSTRENSKY, A.; WESTPHAL, G.G.C.; Respostas adaptativas de peixes a alterações de temperatura e de oxigênio dissolvido. **Archives of Veterinary Science**, v.21, n.3, p.1-16, 2016.