

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA**

BEATRIZ REGINA BRITO DE OLIVEIRA

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE OXITETRACICLINA POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) EM CAMARÃO CULTIVADO**

**Recife, PE
Agosto, 2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA**

BEATRIZ REGINA BRITO DE OLIVEIRA

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE OXITETRACICLINA POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) EM CAMARÃO CULTIVADO**

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura** da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de **Mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura**.

Orientadora: Prof^a **Dr^a. Emiko Shinozaki Mendes**, Depto. de Medicina Veterinária, UFRPE.

**Recife, PE
Agosto, 2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

O48v Oliveira, Beatriz Regina Brito de
Validação e aplicação de método para determinação de oxitetraciclina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em camarão / Beatriz Regina Brito de Oliveira. -- 2008.
81 f. : il.

Orientadora : Emiko Shinozaki Mendes
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Pesca e Aquicultura.

Inclui anexo e bibliografia.

CDD 639. 543

1. *Litopenaeus vannamei*
 2. CLAE
 3. Antibiótico
 4. Doenças
- I. Mendes, Emiko Shinozaki
 - II. Título

A **André Lavorante** e à **Clara**, com todo amor.

À minha família e amigos, em especial à minha mãe **Rute**, à memória do meu pai **Eduardo**, ao meu irmão **Henrique**, à minha sobrinha **Letícia Regina** e à minha tia-avó **Ana Rita**, por me mostrarem que os obstáculos da vida podem ser vencidos com amor, força de vontade e dedicação.

À professora, amiga e conselheira de vida, **Emiko Shinozaki Mendes**, por toda solicitude em contribuir com o meu amadurecimento pessoal e profissional, todo o meu carinho, respeito e admiração.

Às minhas amigas **Paloma Santos** e **Suely Bezerra**, pelo companheirismo em todos os momentos e por assumirem os papéis de irmãs e incentivadoras incansáveis.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pela oportunidade de ter constituído o Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura (PPG-RPAq) e por ter contribuído para a aquisição de novos conhecimentos, em especial ao Departamento de Pesca e Aquicultura, pela disponibilidade da estrutura da Estação Experimental Professor Johei Koike para realização dos experimentos.

Ao Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP) por ter sido a minha escola profissional desde o início da minha formação e pela disponibilidade de recursos e estrutura fundamentais à realização deste trabalho, destacando-se a pesquisadora Dra. Sônia Valéria Pereira pelo carinho, alegria, amizade e despertar para a aquisição de novos conhecimentos e MSc. Cláudia da Costa Lima Neves pelas palavras de encorajamento e pelas sugestões fundamentais para o bom desenvolvimento desta dissertação.

Ao professor Dr. Eudes de Souza Correia e ao Engenheiro de Pesca e amigo Ugo Lima, pelo carinho, disponibilidade de recursos e apóio técnico durante a parte experimental deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Inspeção de Carne e Leite do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE: à Dra. Lílian Góes, à MSc. Fernanda Meirelles, às médicas veterinárias Andréa Barretto, Joanna Dourado, Dulcilene Lacerda, Simone Lira, Priscilla Marcelino, João Guimarães e ao graduando Bruno Nascimento, pelo auxílio e presteza durante todo o período de desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Contaminantes Químicos e Biológicos (LEMI) do ITEP: Dr. Éden Albuquerque, Dr. Antônio Travassos Júnior, aos biólogos Henrique Carlos Marinho, Tarciana Leonídio, Mônica Couto e Jamile Gomes, e a Flávio Gervásio, pelo apoio técnico, amizade e prontidão em todos os momentos.

A todos os professores do PPG-RPAq por terem ofertado uma rica fonte de novos conhecimentos e proporcionado meu aperfeiçoamento profissional. Em especial aos Professores Eudes de Souza Correia, Emiko Shinozaki Mendes, Fernando Leandro dos Santos, Raquel Coimbra e Alfredo Olivera Galvez.

Aos colegas do PPG-RPAq pela amizade e companheirismo em especial a José Carlos Pacheco, pela amizade e auxílio técnico durante o experimento.

À funcionária Selma A. Santiago, pelo auxílio e gentilezas.

À Paula Tiyemi Shinozaki Mendes, pelo acompanhamento e realização das análises estatísticas e por toda disponibilidade para comigo.

Aos Engenheiros de Pesca Daniel Rodrigues, Gustavo Henrique, Thales Veríssimo, pela assistência durante a realização dos cultivos, assim como a Glauber Carvalho, Pedro Duque e Rodrigo Carvalho, pelas informações técnicas e demais colaborações.

RESUMO

O camarão marinho *Litopenaeus vannamei* é a espécie que mais se destaca na carcinicultura brasileira. Uma das ameaças ao crescimento desta atividade em todo o mundo é a incidência de enfermidades que afetam os animais cultivados, sendo por isso, uma das possíveis ações adotadas para prevenir ou tratar animais enfermos é o uso de antibióticos, como a oxitetraciclina (OTC). Sendo assim, a partir de uma metodologia validada baseada na técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por arranjo de diodos (DAD), avaliaram-se os níveis de oxitetraciclina em camarões cultivados em tanques e alimentados com ração adicionada do antibiótico objetivando-se avaliar a metodologia. Após o término do tratamento dos camarões com OTC nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,5 mg/Kg de ração durante 14 dias foi avaliada a concentração deste antibiótico no músculo e na carapaça dos animais até 22 dias após suspensão da medicação. Verificou-se que o método validado atende ao uso pretendido e foi observado maior tempo de residência da droga na carapaça dos animais cultivados em experimento (de 10 a 13 dias) quando comparado ao do músculo (cinco dias). Não houve diferença estatística ($P \geq 0,05$) entre os tratamentos utilizados em relação aos níveis de OTC no músculo e na carapaça. É importante ressaltar a importância de um maior controle da qualidade dos fármacos utilizados na aquicultura, assim como, a falta de revisão de normas nacionais e internacionais quanto à utilização nas análises do camarão inteiro, e não somente do músculo, para avaliação da conformidade de crustáceos quanto ao resíduo de OTC.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, CLAE, antibiótico.

ABSTRACT

The white shrimp *Litopenaeus vannamei* is the species that stands out most in Brazilian shrimp culture. One of the threats to the growth of this activity is the occurrence of diseases that affect the cultured animals, and hence, one of the actions taken to prevent or treat sick animals, the use of antibiotics, such as oxytetracycline (OTC). High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Detection Array of Diodes (DAD) was used to evaluate the OTC's levels in shrimps cultured in tanks and treated with the drug. After the end of the treatment of shrimps with medicated feed containing OTC at 0,2; 0,4 and 0,5 mg/kg for 14 days, the elimination of antibiotic in muscle and the carapace of the animals until 22 days after medication was evaluated. It was verified through the results that the validated method intended to use and the OTC depletion was greater in carapace of animals (from 10 to 13 days) when compared to the muscle (five days). There was no statistical difference ($P \geq 0,05$) between treatments used for levels of OTC in muscle and carapace. It is essential to point out the importance of quality control of drugs used in aquaculture as well as the deficient review of national and international standards about the use in the analyses of the shrimp whole, and not just the muscle, to evaluate the accordance of OTC residue in sample of crustaceans.

Key Words: *Litopenaeus vannamei*, HPLC, antibiotic.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Produção de camarões.....	12
2.2 Enfermidades bacterianas na carcinicultura.....	14
2.3 Antibióticos na aquicultura.....	16
2.4 Oxitetraciclina.....	19
2.5 Resistência bacteriana e suas implicações.....	21
2.6 Legislação para utilização de fármacos em espécies animais.....	23
2.7 Métodos de análise de OTC em matrizes animais.....	25
2.8 Validação de métodos analíticos.....	29
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	32
Manuscrito – “Validação e determinação de oxitetraciclina em camarão marinho <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931)” por CLAE-DAD.....	33
Resumo.....	34
1 Introdução.....	35
2 Material e Métodos.....	37
3 Resultados.....	42
4 Discussão.....	44
5 Conclusão.....	48
6 Agradecimentos.....	49
Referências.....	50
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXO	69
Normas da Revista <i>Aquaculture</i>	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais países produtores de camarão.....	12
Tabela 2. Fármacos comumente utilizados em fazendas de aqüicultura.....	18
Tabela 3. Fármacos e LMR estabelecidos no PCR.....	24
Tabela 4. Métodos para determinação de OTC em camarão por CLAE.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da OTC.....	19
---	----

1. INTRODUÇÃO

A possibilidade de cultivo de animais aquáticos existe em todo o mundo, porém são as condições naturais e técnicas que determinam a escolha dos locais e das espécies a serem produzidas. Uma das espécies que se destaca no cenário da atividade aquícola é o camarão marinho *Litopenaeus vannamei* que, devido à sua capacidade de adaptação, vem se tornando uma das mais cultivadas em todo o mundo, inclusive no Brasil que se encontra entre os dez maiores produtores mundiais de camarão.

A carcinicultura brasileira, apesar do crescimento acelerado até o ano de 2003, enfrentou alguns desafios no ano de 2004, como a aplicação de taxas pelos países importadores e o surgimento de doenças infecciosas nos animais cultivados, fatos que acarretaram uma perda de 15,9% na produção (ABCC, 2007).

Com a ascensão de enfermidades em cultivos em todo o mundo, a administração de antimicrobianos encontra-se como uma possibilidade para prevenir ou combater doenças, sendo a oxitetraciclina (OTC) citada como um dos compostos de uso mais comum em camarões cultivados por apresentar baixa toxicidade e eficiência contra bactérias Gram-negativas e positivas.

Com a possível utilização de medicamentos veterinários na carcinicultura e com as crescentes exigências dos mercados consumidores quanto à segurança dos alimentos de origem animal, foram estabelecidos programas e normas para fiscalizar os níveis de substâncias danosas à saúde humana.

O mercado europeu possui um dos mais rigorosos critérios de avaliação de produtos alimentícios e é o principal destino dos camarões produzidos no Brasil. A avaliação dos riscos dos alimentos da União Européia é feita pela *Health and Consumer Protection Directorate-General* que publica relatórios anuais no *Rapid Alert System for food and Feed* (RASFF) com a informação ao consumidor quanto à presença de substâncias danosas nos alimentos. A transmissão imediata dos resultados dessa avaliação para os membros da Comunidade Européia constitui uma ação emergencial denominada de alerta. Em 2006, os alertas emitidos para crustáceos corresponderam a 20% do total para todos os grupos de alimentos analisados (RASFF, 2006).

A análise dos níveis de resíduos em alimentos deve ser realizada utilizando-se métodos validados e baseados em técnicas conceituadas internacionalmente que ofereçam resultados de qualidade através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade.

O monitoramento eficaz e permanente, as adaptações da produção quanto às exigências de segurança alimentar, a fundamentação científica e o controle ambiental constituem demandas que, se adequadamente contempladas, aumentam as perspectivas para o setor de aquicultura no Brasil.

De acordo com o exposto, aspectos sanitários e ambientais da utilização de OTC ainda são pouco conhecidos e, portanto, fazem-se necessários estudos que avaliem os níveis de resíduo da droga em camarões *in vivo*, quantificando-a através de uma metodologia validada baseada na técnica de CLAE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de camarões

O cultivo de camarão é um dos segmentos da aquicultura que mais se destaca, no contexto do setor pesqueiro mundial, por viabilizar oportunidades para empreendedores e gerar empregos e renda para as populações litorâneas de países em desenvolvimento (ROCHA e ROCHA, 2007).

A produção mundial de camarão cultivado cresceu de 917.273 toneladas (t) em 1996 para 2.733.134 t em 2005 em relação ao total de camarões capturados e cultivados (6.082.600 t) o que representa 45% desse total (FAO, 2008).

Países como China, Tailândia, Vietnã, Índia e Indonésia dominam o mercado mundial da carcinicultura (Tabela 1). Estes países passaram por diversas experiências quanto ao surgimento de enfermidades e fornecem exemplos de perdas e ganhos para países menos experientes.

Tabela 1. Principais países produtores de camarão em 2005.

<i>Principais países produtores</i>	<i>Produção (t)</i>	<i>Produtividade (kg/ha/ano)</i>
China	1.024.949	3.416
Tailândia	375.320	5.864
Vietnã	327.200	453
Indonésia	279.539	708
Índia	130.805	769
Equador	130.000	867
México	72.279	1.681
Brasil	65.000	4.333
Bangladesh	63.052	435
Filipinas	39.909	1.330
América Central*	41.919	1.048

* (Bahamas, Belize, Costa Rica, Cuba, El Salvador, Guatemala, Honduras, Jamaica, Nicarágua, Panamá, Porto Rico, República Dominicana)

Fonte: FAO (2008)

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de camarões e o maior das Américas. Entre 1998 e 2003, a produção de camarões cultivados no país cresceu significativamente, passando de 7.250 t para cerca de 90.000 t/ano. Entre 2002 e 2003, a exportação de camarão teve um crescimento de 54,6% (FAO, 2008).

A Região Nordeste detém 93% da produção de camarões do país, o que ocasiona geração de renda e de empregos diretos e indiretos que são ocupados em sua maioria (88%) por trabalhadores das camadas mais pobres da população rural (SAMPAIO e COSTA, 2003). O estado de Pernambuco, que ocupa a quarta posição no *ranking* nacional, possui cerca de 100 fazendas com uma área de 1.108 ha de viveiros e encerrou o ano de 2004 com uma produção de 4.531 t (ABCC, 2005a).

A carcinicultura brasileira enfrentou vários problemas no ano de 2004, dentre eles se destacam a aplicação de sobretaxa (*antidumping*) de 7,05%, que acarretou na redução das exportações para os Estados Unidos, e o surgimento de enfermidades em muitas fazendas (ABCC, 2005b). Estes fatores contribuíram para diminuição da produção de 75.900 t em 2004 para 65.000 t em 2005 (FAO, 2008).

Com todos estes obstáculos para a exportação, a carcinicultura brasileira procurou desvincular sua receita das variações de câmbio a fim de reduzir perdas financeiras. Com isto, desde 2004, uma alternativa foi o direcionamento da produção para o mercado interno, que cresceu para 25%, 35% e 53% nos anos de 2004, 2005 e 2006, respectivamente (ABCC, 2007).

Por tudo isso, mesmo diante de fatores econômicos e aspectos sanitários que interferem na velocidade de crescimento do setor, observa-se que a produção de camarão cultivado apresenta-se promissora do ponto de vista econômico (ABCC, 2007).

2.2 Enfermidades bacterianas nos camarões cultivados

As doenças que acometem os camarões podem ser causadas por vírus, bactérias, fungos, protozoários e outros organismos, sendo os dois primeiros os mais relevantes por estarem relacionados com altas mortalidades e causarem enormes prejuízos em todas as etapas de cultivo dos animais (GESTEIRA, 2006).

As enfermidades virais são responsáveis por grandes perdas na produção e mais de 20 vírus são conhecidos como agentes infectantes de camarões cultivados e silvestres. Segundo Madhavi et al. (2002), as espécies virais de maior gravidade em camarão são as causadoras da Síndrome da Mancha Branca (WSSV, do inglês: *White Spot Syndrome Virus*), da Síndrome da Cabeça Amarela (YHV, do inglês: *Yellow Head Virus*), da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV, do inglês: *Infectious Hypodermal and Haematopietic Necrosis Virus*) e da Síndrome de Taura (TSV, do inglês: *Taura Syndrome Virus*).

Comumente observa-se que camarões acometidos de doença viral apresentam também infecção bacteriana por se apresentarem imunodeprimidos. Sendo assim, as bactérias desempenham importante papel

como agentes desencadeadores de doenças infecciosas secundárias, apesar de serem essenciais para o funcionamento normal dos ciclos biogeoquímicos dos viveiros (BARBIERI JR e OSTRENSKY NETO, 2002).

De acordo com Lightner (1983), quando o ambiente de cultivo tem alterações das propriedades físico-químicas como temperatura, salinidade e pH, estas podem ocasionar um desequilíbrio que leva os camarões a uma maior vulnerabilidade às doenças, como consequência do oportunismo da microbiota normalmente presente no ambiente. Dentre as principais enfermidades de origem bacteriana que acometem os camarões, destacam-se a Hepatopancreatite Necrotizante (NHP, do inglês: *Necrosis Hepatopancreatit*) e as vibrioses, causadas por bactérias do gênero *Vibrio*.

A NHP é uma doença causada por uma alpha-protobactéria intracelular obrigatória, Gram-negativa, pertencente ao gênero *Rickettsia*, responsável por mortalidades de 20 a 95% em viveiros de camarão nas Américas Central e do Sul (FRELIER et al., 1992; LOY et al., 1996). Caracteriza-se, principalmente, pela proliferação destas bactérias nas células epiteliais do hepatopâncreas do camarão e encontra-se associada com anorexia, letargia, redução no crescimento e atrofia no músculo abdominal (LOY et al., 1996).

Espécies do gênero *Vibrio* são anaeróbicas facultativas, Gram-negativas em forma de bastonetes retos ou curvos, medem entre 0,5 e 0,8 μm de diâmetro e 1,4 e 2,4 μm de comprimento (TISSON, 1999). Os víbrios estão naturalmente presentes na água, no sedimento e na flora interna dos camarões, podendo causar doenças com taxas de mortalidade de até 100%. Dentre eles, acredita-se que o *Vibrio harveyi* seja o causador de uma

importante enfermidade denominada de “bolitas”, que acomete animais em estágios larvais (BARBIERI JR e OSTRENSKY NETO, 2001).

Os vibrios estão amplamente distribuídos em ambientes aquáticos de diferentes salinidades e podem infectar os peneídeos quando estes são submetidos a situações de estresse (BOWER, 1997; BROCK e MAIN, 1994; LIGHTNER, 1996; RIBEIRO, 2005). Os animais infectados geralmente apresentam como sintomas principais inflamação nas células hemocíticas e formação de nódulos no órgão linfóide, brânquias, hepatopâncreas, epitélio cuticular e tecido conjuntivo, porém podem ser encontradas diferentes sintomatologias como a bioluminescência, necrose cuticular e mudanças na coloração do exoesqueleto e músculo (ANDERSON et al., 1988; MERMOUD et al., 1996).

Em função da ocorrência de bacterioses em cultivos de camarões, o uso indiscriminado de antibióticos disseminou-se em várias regiões do mundo com conseqüências negativas tanto ambientais, quanto econômicas e legais (BARBIERI JR. e OSTRENSKY NETO, 2001; CARVALHO, 2004).

2.3 Antibióticos na aquicultura

Os resíduos de antibióticos oriundos da aquicultura podem afetar ecossistemas marinhos e costeiros. São escassos os estudos de ecotoxicidade dos antibióticos nos ambientes aquáticos, porém recentes pesquisas já revelaram uma toxicidade elevada para algas (HOLTEN-LUTZHOFT et al.,

1999) e para o microcrustáceo *Daphnia magna* (WOLLENBERGER et al., 2000).

Segundo Lyle-Fritch et al. (2006), mais de 106 diferentes produtos foram usados em estabelecimentos de aquicultura no México em decorrência de enfermidades, dentre eles: aditivos alimentares, fertilizantes inorgânicos e antibióticos. Países como Filipinas e Tailândia também realizaram estudos similares, onde 70 tipos de produtos químicos e biológicos foram relatados.

Os antibióticos podem ser administrados de várias formas nos organismos aquáticos para tratamento de infecções (AGUIRRE-GÚSMAN et al., 2004). A injeção intramuscular ou via *sinus* de antimicrobianos nos animais é bastante laboriosa, exigindo trabalho intensivo e tornando-se uma ação impraticável nas fazendas de cultivo, mas é o modo mais rápido de distribuição dos fármacos nos organismos.

Os banhos de imersão de longa ou de curta duração em soluções contendo o antibiótico são uma alternativa para tratamento de infecções dos animais, pois, além de resultar num menor volume de rejeito que contêm antibióticos, permitem um maior controle e tratamento para sua liberação no meio ambiente. Em infecções sistêmicas, como as vibrioses, os banhos não geram resultados satisfatórios devido aos baixos níveis da droga encontrados em animais medicados, abaixo da concentração inibitória mínima para a maioria das espécies de *Vibrio* spp. (RIGOS et al., 2006).

A ingestão de antimicrobianos através da ração se torna uma alternativa viável e eficiente para os produtores. No entanto, é necessário avaliar características como lixiviação, biodisponibilidade do princípio ativo,

digestibilidade e palatabilidade (RIGOS et al., 1999). Segundo os mesmos autores, um antibiótico adequado para terapia oral deve estar distribuído uniformemente na ração e em quantidade suficiente para um período de tempo adequado sem afetar a palatabilidade da dieta e apresentar lixiviação insignificante antes de ser consumido pelo animal.

Para administração de antibióticos para animais em cultivos fazem-se necessárias várias informações acerca da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os agentes patogênicos, do tempo de depleção da droga no animal cultivado visando à segurança alimentar e conhecimento dos efeitos diversos sobre o ambiente. Vários autores realizaram estudos realizados na Dinamarca, nos EUA, na Itália e no México (CHRISTENSEN et al., 2006; LALUMERA et al., 2004; DIETZE et al., 2005; LYLE-FRITCH et al., 2006) e relataram que dentre os antibióticos e antimicrobianos mais comuns de uso na aquicultura, em todos os levantamentos realizados, encontra-se a OTC (Tabela 2).

Tabela 2. Fármacos comumente utilizados em fazendas de aquicultura.

<i>Listas dos fármacos mais utilizados por país</i>			
<i>Dinamarca</i>	<i>EUA</i>	<i>Itália</i>	<i>México</i>
Oxitetraciclina Acido Oxolínico Eritromicina Florfenicol Flumequina	Ormetoprim Oxitetraciclina Florfenicol Sulfadimetoxina	Amoxilina Flumequina Oxitetraciclina Sulfamerazina Tianfenicol	Fluorquinolonas: (Norfloxacin, Enrofloxacin, Sarafloxacin) Oxitetraciclina Sulfocloropiridazina

Fonte: Christensen et al., 2006; Lalumera et al., 2004; Dietze et al., 2005; Lyle-fritch et al., 2006

2.4 Oxitetraciclina

As tetraciclinas (TC) representam uma das mais importantes famílias farmacológicas de antibióticos e possuem um largo espectro de ação antibacteriana. Dentre as tetraciclinas, a oxitetraciclina, a tetraciclina e a clortetraciclina são as mais utilizadas em medicina humana, em nutrição animal e em aditivos alimentares destinados ao uso veterinário (COUTO et al., 2000).

A oxitetraciclina (OTC) é proveniente do metabolismo do *Streptomyces rimosus* e sua ação é principalmente bacteriostática, responsável por inibir a síntese protéica ligando-se à subunidade ribossomal 30S (ALIABADI e LEES, 2000). É ativa contra uma ampla gama de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, inclusive contra certas cepas resistentes à penicilina, micoplasmas, alguns vírus e protozoários (OKA et al., 2000).

A OTC é absorvida rapidamente e distribuída em concentrações eficazes nos fluidos e tecidos do corpo, devido ao fato de, na sua estrutura molecular (Figura 1) de fórmula $C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot 2H_2O$, apresentar um grande número de possíveis locais de ligação, caracterizados pela grande quantidade de grupos hidroxila e pela presença do grupo amino (COUTO et al., 2000).

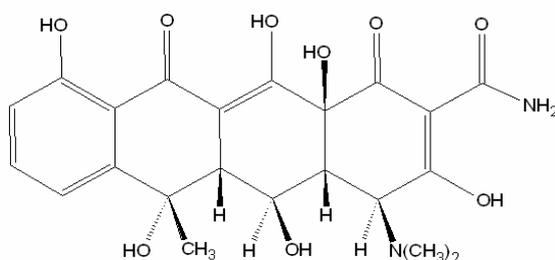


Figura 1. Estrutura molecular da OTC. Fonte: USP, 2005

A OTC é citada como um dos antibióticos mais utilizados na carcinicultura (LYLE-FRITCH et al., 2006) e de acordo com Barbieri Júnior e Ostrensky Neto (2002) pode ser administrada em várias etapas do cultivo de camarões. É eficiente no tratamento de vibrioses em camarões e apresenta uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) que varia de acordo com a espécie em questão, oscilando na faixa de 0,2 a 100 mg/L (RUANGPAN & KITAO, 1992; LIGHTNER et al., 1997).

Cruz-Lacierda et al. (2000) relataram a incorporação de oxitetraciclina à ração para tratamento de camarões com vibriose luminescente, enfermidade causada por bactérias do gênero *Vibrio*. Barbieri Jr. e Ostrensky Neto (2002) recomendaram tratamento com adição do antibiótico à ração e administração durante sete dias consecutivos para controlar a NHP. Vários são os tratamentos adotados variando-se a concentração de OTC na ração e o tempo de medicação. Mohny et al. (1997) incorporaram 1,5 g/Kg de OTC na ração que foi administrada durante 14 dias a *Penaeus stylirostris*. Bray et al. (2006) avaliaram concentrações de OTC na ração na faixa de 4,5 a 22,5 g/Kg por 14 dias e Nogueira-Lima et al. (2006) adicionaram OTC na ração na concentração de 4,5 g/Kg sendo esta ofertada aos camarões por 14 dias e verificaram uma maior taxa de sobrevivência quando foi realizada a medicação.

Com a incorporação de OTC nos tecidos dos animais medicados, surge a possibilidade do aparecimento de efeitos tóxicos para humanos, que incluem sintomas como irritações gastrointestinais, desconforto abdominal, náuseas e vômitos. Também já foram relatadas esofagite, úlceras esofágicas, pancreatite, diarreia e alterações no fígado e nos rins. Alguns casos de fototoxicidade foram registrados, com o surgimento de lesões cutâneas após

exposição à luz solar. Devido à sua propriedade quelante, pode ocasionar escurecimento dos dentes e depositar-se nos ossos. As reações de hipersensibilidade, como a anafilaxia, podem ocorrer, porém são raras (BRUNTON, 2006).

Conseqüências ambientais podem permanecer por anos. Halling-Sorensen et al. (2003) relatam que a maioria dos agentes antimicrobianos perde seu potencial de ação em condições aeróbicas. Em condições anaeróbicas, antibióticos como a OTC mantêm seu potencial bacteriostático acumulando-se no sedimento. Em viveiros de aquicultura da Itália e na Tailândia, foram detectados baixos níveis de OTC no sedimento após dois anos da última aplicação do antibiótico (LALUMERA et al., 2004; VISUTHISMAJARN et al., 2005).

2.5 Resistência bacteriana e suas implicações

O uso de antibióticos em animais de forma inadequada tem sido motivo de preocupação, devido à possibilidade surgimento de bactérias resistentes e conseqüentemente de transferência destas bactérias para os humanos. Embora o tratamento com antibióticos seja a maneira mais rápida de se obter resposta a uma doença bacteriana na aquicultura, também pode ser contraproducente, porque os antibióticos podem induzir a resistência quando utilizados tanto em subdosagens, como também em superdosagens (MENDES et al., 2004).

Segundo Moriarty (2004), as elevadas quantidades terapêuticas ou superdosagens podem causar resistência devido à seleção genética, com ponto de mutação aleatório, pois os antibióticos não só selecionam bactérias que são resistentes, como também induzem a uma rápida propagação de genes com resistência a múltiplos antibióticos.

Bactérias resistentes a antimicrobianos foram isoladas de sedimentos de áreas próximas a fazendas de peixes em vários países (HERWIG et al., 1997; SHMIDT et al., 2000; TENDÊNCIA e DE LA PEÑA, 2001) e de camarões no Vietnã (XUAN LE et al., 2005). Abraham et al. (1997) isolaram cepas de *V. harveyi* de camarões doentes que foram resistentes a OTC e a outros antibióticos.

A transferência de plasmídios de resistência entre bactérias de ambiente de aquicultura e seres humanos foi proposta por Rhodes et al. (2000). Pouco é sabido sobre efeitos toxicológicos dos antibióticos usados na aquicultura em organismos não-alvo e no ambiente (WESTON, 1996), mas com base em estudos recentes evidencia-se que diversos antibióticos, incluindo a OTC, são moderados ou altamente tóxicos aos organismos aquáticos, como algas e invertebrados (HOLTEN LUTZHOFT et al., 1999; HALLING-SORENSEN, 2000; HALLING-SORENSEN et al., 2000; WOLLENBERGER et al., 2000).

A resistência bacteriana e a toxicidade para organismos aquáticos, os impactos à saúde humana e os efeitos danosos ao desenvolvimento econômico do setor são possíveis consequências da administração descontrolada de antibióticos nos cultivos de camarões.

Efeitos positivos para o produtor e, simultaneamente, redução dos impactos ambientais e na saúde humana podem ser resultantes de um maior controle do uso de antibióticos nas atividades que produzem alimentos de origem animal, como a carcinicultura (HOLMSTRÖM, 2003).

2.6 Legislação para utilização de fármacos em espécies animais

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) proíbe o uso de tetraciclina como aditivos alimentares, promotores de crescimento ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 1998). Para atender às exigências da comunidade europeia, foi criado, no início de 2006, o Programa de Controle de Resíduo em Pescado (PCRP) no qual não está recomendada a análise de tetraciclina, estando este dentro do Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) (BRASIL, 2006). Em virtude da necessidade de se avaliar os níveis de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, com vistas à segurança alimentar, reuniões de caráter emergencial foram realizadas entre os representantes do PCRP, do setor requisitos da União Europeia, com isto, em junho de 2006, a análise das tetraciclina foi incluída no Plano Emergencial do PCRP.

O PCRP fiscaliza o uso de vários antibióticos e regulamenta Limites Máximos de Resíduos (LMR) para estas substâncias em pescado em atendimento às normas europeias (Tabela 3). Anualmente, desde o ano de 2006, são publicadas Instruções Normativas que aprovam os PNCR em diversas matrizes de origem animal, incluindo pescado. Para o exercício de 2008, a Instrução Normativa nº 10 (BRASIL, 2008) informa quais serão as

análises requeridas para cada matriz e estabelece que apenas laboratórios credenciados possam participar do programa.

Tabela 3. Fármacos e LMR estabelecidos no PCR.P.

<i>Substância</i>	<i>LMR (mg/Kg)</i>	<i>Matriz</i>
Tetraciclina	0,1 (ou somatório)	
Oxitetraciclina	0,1 (ou somatório)	
Eritromicina	NE	
Ampicilina	0,05	Músculo
Sulfametazina	0,05	
Furazolidona	*	
Nitrofuranos	*	
Clorofenicol	*	

LMR: Limite Máximo de Resíduo; PCR.P: Plano Controle de Resíduo em Pescado; NE: Não estabelecido; (*) Para drogas proibidas não se estabelece LMR;

Diante da importância do controle residual de drogas veterinárias também foi criado o Programa de Análises de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com a finalidade de avaliar os níveis de resíduos em alimentos (BRASIL, 2003).

Com o objetivo de disciplinar os procedimentos e práticas da cadeia produtiva do camarão marinho, a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC) editou o código de conduta, visando a qualidade do camarão cultivado. Neste documento, estão referenciados os parâmetros e os padrões de qualidade de alimentos fundamentados nas normativas do MAPA, do *Codex Alimentarius* da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e da Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS), da *Food and Drug Administration* (FDA) e da Comunidade Européia (ABCC, 2005).

Nos Estados Unidos, o tratamento de enfermidades com o uso da OTC em salmões, bagre americano e lagosta é permitido sob circunstâncias especificadas pelo regulamento do *Code of Federal Regulations* (21 CFR 556.500), sendo estabelecido um limite de tolerância de 2 mg/Kg de OTC para gêneros alimentícios frescos (FDA, 1998). Fazendas de camarão americanas estão legalmente utilizando OTC para o tratamento de NHP através de uma *Investigational New Animal Drug* (INAD), emitida pela FDA. Em 2006, o *Codex Alimentarius* emitiu um documento que estabelece o LMR de 0,2 mg/Kg de OTC para músculo de pescado (CODEX ALIMENTARIUS, 2006).

A *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA), agência para a avaliação de produtos medicinais responsável pelos regulamentos da União Européia, ajustou o LMR da OTC para 0,1 mg/Kg em quaisquer gêneros alimentícios (EMA, 1990), incluindo espécies cultivadas em fazendas de aquicultura.

2.7 Métodos de análise de OTC em matrizes animais

Um dos métodos oficiais para determinação de OTC em alimentos é baseado na utilização de microrganismos como *Bacillus cereus* para produção de halo de inibição em placas de Petri contendo meios de cultura específicos (AOAC, 2000). Esta técnica apresenta custo elevado, requer maior tempo para obtenção dos resultados e é considerada de baixa sensibilidade e especificidade (MILLER et al., 1973).

A *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) publicou um método para determinação de tetraciclinas em tecidos animais por CLAE, porém é aplicável para análise de músculo de bovinos e suínos (AOAC, 1995).

Diante da necessidade de métodos precisos e específicos, metodologias de detecção para OTC baseados em diversas técnicas foram desenvolvidas e são largamente utilizadas (SCHNEIDER et al., 2007). Desde a descoberta das tetraciclinas aproximadamente em 1900, técnicas diversas têm sido empregadas para sua separação, detecção e quantificação, dentre elas a Cromatografia de Camada Delgada (CCD) que é uma técnica de baixo custo, porém com altos limites de detecção (OKA et al., 2000).

Outra técnica aplicada quando as substâncias apresentam elevados limites de detecção é a eletroforese capilar, com a vantagem de gerar pequeno volume de solvente nas análises e de ser bastante rápida, porém não é muito empregada para análise de resíduos em alimentos devido a menor sensibilidade que a CLAE (CHEN e GU, 1995).

Métodos que utilizam a detecção espectrofluorométrica, apesar de constituírem uma técnica rápida, dependendo das propriedades químicas do analito, não são sensíveis para análise de matrizes complexas (FERNANDEZ-GONZALEZ et al., 2002).

Uma técnica comumente utilizada é a CLAE, que embora apresente custos de instrumentação e de manutenção elevados, possui importantes vantagens, como menor tempo de análise, alta resolução, resultados quantitativos precisos e automatização (ANDERSON et al., 2005). O uso da CLAE é comum para determinação de diversos antibióticos em matrizes

complexas, como os alimentos de origem animal (TOURAKI et al., 2004; PENA et al., 2005). Esta técnica de separação emprega colunas recheadas de material específico (fase estacionária) e uma fase móvel. Todo o sistema é submetido a uma alta pressão (COLLINS et al., 2006). As etapas das metodologias analíticas consistem em uma extração em fase líquida com uma possível limpeza em cartuchos de fase sólida com posterior separação e detecção empregando a CLAE. Diversos trabalhos publicados (Tabela 4) empregaram esta técnica como meio de quantificar OTC, porém não existe um método oficial específico definido.

Na Tabela 4 observa-se que as etapas de extração para OTC por CLAE apresentam características similares, os métodos se diferenciam principalmente pelos limites de detecção encontrados, pelas condições cromatográficas e pela etapa de extração em fase sólida ou *clean up*. É importante observar o método de NOGUEIRA-LIMA et al. (2006), pois foi desenvolvido e testado na região Nordeste do Brasil, sendo um método específico para análise de OTC por CLAE em *L. vannamei*.

Tabela 4. Métodos para determinação de OTC em camarão por CLAE.

<i>Espécie de camarão</i>	<i>Extração em fase líquida</i>	<i>Limpeza em fase sólida</i>	<i>Condições cromatográficas</i>	<i>Limite de detecção</i>	<i>Referência</i>
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Tampão McIlvaine EDTA	Cartucho com sílica C-18	FL: 380/520 nm FM: tampão imidazol com acetato de magnésio e MeOH	Não informado	BRILLANTES et al., 2001
<i>Penaeus japonicus</i>	Ácido tricloroacético 5% com 0,5% EDTA	Cartucho com sílica C-18	UV: 365 nm FM: ácido oxálico, ACN, MeOH	0,02 mg/Kg	UNO, 2004
	MeOH 30% 0,5% EDTA	Não	UV: 360 nm FM: ácido oxálico	Não informado	SABGRUNGRU ANG et al., 2004
<i>Penaeus monodon</i>	Ácido tricloroacético 5% 0,5% EDTA	Cartucho com sílica C-18	FL: 380/520 nm FM: tampão imidazol com acetato de magnésio e MeOH EDTA	0,008 mg/Kg	UNO et al., 2006
<i>Litopenaeus setiferus</i>	Ácido oxálico e MeOH	Não	UV: 350 nm FM: ácido oxálico, ACN, MeOH	0,05 mg/Kg	REED et al., 2004; REED et al., 2006
	Tampão McIlvaine 30% MeOH 0,05% EDTA	Não	UV- 365 nm FM: ácido oxálico, ACN, MeOH, tetrahidrofurano	0,05 mg/Kg	NOGUEIRA-LIMA et al., 2006
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Tampão McIlvaine EDTA	Cartucho com sílica C-18	UV – 360 nm FM: ácido oxálico, ACN, MeOH	0,04 mg/Kg	FROONGSARN G et al., 2007
	Não	Cartucho com sílica C-18	UV- 365 nm FM: ácido oxálico, ACN, MeOH	0,01 mg/Kg	GOMEZ-JIMENEZ et al., 2008

FL: Detecção por Fluorescência; UV: Detecção por Ultra-Violeta; FM: Fase móvel; ACN: Acetonitrila; MeOH: Metanol.

2.8 Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico garante que as informações geradas sobre uma amostra sejam confiáveis e interpretáveis (RIBANI et al., 2004). Portanto, validar é comprovar, através do fornecimento de evidência objetiva, que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos, garantindo a qualidade analítica (NBR ISO 9000).

A capacidade de demonstrar a confiabilidade de resultados analíticos na avaliação da conformidade de seus produtos constitui um dos fatores para avaliar o potencial competitivo do país exportador frente ao comércio internacional. Estes resultados devem ser obtidos através de metodologias validadas, acompanhados por valores de incerteza e rastreáveis a padrões internacionais (OLIVEIRA et al., 2007).

As normas internacionais da *International Standards Organization* (ISO), da *United States Pharmacopeial Convention* (USP), da FDA, da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e sistemas da qualidade (Boas Práticas de Laboratório- BPL; Norma NBR ISO/IEC 17025) requerem a validação de métodos analíticos e a documentação dos resultados de validação (BARROS, 2005). O laboratório pode ainda optar por uma documentação que contenha as especificações dos requisitos técnicos, as características de desempenho obtidas, os critérios de aceitação para as características de desempenho e a afirmação da validade dos resultados quanto ao atendimento do uso pretendido (INMETRO, 2007).

No Brasil, as características de desempenho do método (parâmetros de validação) são estabelecidas de acordo com recomendações de órgãos

competentes, como o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2007) as quais se encontram abaixo descritas:

- Limite de detecção do equipamento: é definido como a concentração do analito que irá produzir um sinal de três a cinco vezes maior que a razão ruído/sinal do equipamento;
- Faixa de trabalho: intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio;
- Linearidade: corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de trabalho;
- Seletividade: uma amostra é composta, de maneira geral, dos analitos a serem medidos, da matriz e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito de outros é chamado seletivo;
- Repetitividade: expressa como coeficiente de variação, representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas;

- Recuperação: grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro;
- Limite de detecção do método: concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero;
- Limite de quantificação do método: menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade;

De acordo com o exposto, fatores econômicos, aspectos sanitários e ambientais da utilização de OTC na carcinicultura ainda são pouco conhecidos e, portanto, faz-se necessária a validação e a implantação de metodologias para análise de OTC por CLAE. Uma ferramenta que garanta a qualidade do produto e do processo de produção auxilia na consolidação do consumo de um alimento de qualidade e desperta para necessidade de estudos que envolvam saúde pública e abordem possíveis conseqüências ambientais.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Parte dos resultados pertinentes a essa dissertação está apresentada no artigo intitulado “**Validação e determinação de oxitetraciclina em camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) por CLAE-DAD**” (manuscrito) a ser encaminhado para a revista *Aquaculture* cujas normas se encontram no anexo A.

1 **Validação e determinação de oxitetraciclina em camarão marinho *Litopenaeus***
2 ***vannamei* (Boone, 1931) por CLAE-DAD**

3
4
5 Beatriz Regina Brito de Oliveira ^{a,b}, Paloma Nascimento dos Santos ^b, Claudia da
6 Costa Lima Neves ^b, Ugo Lima Silva ^a, Paula Tiyemi Shinozaki Mendes ^c, Emiko
7 Shinozaki Mendes ^{a,d*}

8
9 ^a Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Universidade
10 Federal Rural de Pernambuco (UFRPE); ^b Instituto de Tecnologia de Pernambuco
11 (ITEP). Av. Prof. Luís Freire, 700, Cidade Universitária. Recife/PE, Brasil; ^c Dept° de
12 Estatística (DE), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Av. Prof. Moraes
13 Rego, s/n, Cidade Universitária. Recife/PE, Brasil; ^d Departamento de Medicina
14 Veterinária - UFRPE. Av. Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos. Recife/PE,
15 Brasil.

16

17

18

19

20

21

22

23 * Autor para correspondência. Tel. +55 81 3320 6419

24 Fax: +55 81 3320 6404

25 E-mail: esmendes@yahoo.com

Resumo

O *Litopenaeus vannamei* é a espécie de camarão marinho que mais se destaca na carcinicultura brasileira. Uma das ameaças ao crescimento desta atividade em todo o mundo é a incidência de enfermidades nos animais, afetando a produtividade dos cultivos e uma das possíveis ações adotadas para prevenir ou tratar animais enfermos é o uso de antibióticos, como a oxitetraciclina (OTC). A partir de uma metodologia validada baseada na técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por arranjo de diodos (DAD), avaliaram-se os níveis de oxitetraciclina em camarões cultivados alimentados com ração contendo o antibiótico. Após o término do tratamento dos camarões com OTC nas concentrações de 200, 400 e 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ de ração durante 14 dias foi avaliada a concentração desse antibiótico no músculo e na carapaça dos animais até 22 dias após suspensão da medicação. Concomitantemente ao tratamento, foram realizadas contagens de *Vibrio* spp e acompanhados parâmetros físico-químicos da água nos cultivos. Nos testes de validação do método foi definido coeficiente de correlação linear de 0,9997 para o extrato da matriz fortificado na faixa de trabalho de 0,02 a 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$, recuperação de 106,0 \pm 17,1%, limites de detecção e quantificação do método de 0,006 e 0,019 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Foi observado maior tempo de residência da droga na carapaça dos animais (de 10 a 13 dias) quando comparado ao do músculo (cinco dias). Não houve diferença estatística entre os tratamentos em relação aos níveis de OTC no músculo e na carapaça nas concentrações utilizadas. O método definido atende as normas vigentes e se aplica para determinação desta droga em camarão marinho cultivado. É importante ressaltar a importância de um maior controle da qualidade dos fármacos utilizados na aquicultura, assim como, a falta de revisão de normas nacionais e internacionais quanto à utilização nas análises do camarão inteiro, e não somente do músculo, para avaliação da conformidade de crustáceos quanto ao resíduo de OTC.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, CLAE, antibiótico.

74 **1. Introdução**

75 O cultivo comercial de camarões no Brasil tem quase 40 anos e seu
76 crescimento foi favorecido pelo desenvolvimento de técnicas de cultivo e pela
77 utilização de espécies mais adaptáveis, destacando-se a *Litopenaeus vannamei*,
78 originária do Oceano Pacífico e introduzida no Brasil na década de 80 (BRASIL,
79 2001).

80 A carcinicultura brasileira enfrentou recentemente situações adversas,
81 causadas principalmente pelo surgimento e disseminação de doenças, que
82 contribuíram para uma perda de 27,9% na produção entre os anos de 2003 e 2005
83 (FAO, 2007). A partir do ano de 2006, observou-se uma reação do setor, porém
84 ainda com recuperação gradativa.

85 As doenças que acometem os camarões podem ser causadas por vírus,
86 bactérias, fungos, protozoários e outros organismos. Apesar dos vírus apresentarem
87 papel de agentes etiológicos primários responsáveis por grandes perdas nos
88 cultivos, as bactérias se destacam por estarem naturalmente presentes na água,
89 possuírem papel significativo nos ciclos biogeoquímicos dos ambientes aquáticos e
90 serem potenciais causadoras de bacterioses de etiologia primária ou secundária
91 (Barbieri Jr e Ostrensky Neto, 2002). Dentre as doenças de origem bacteriana,
92 destacam-se aquelas causadas pelas do gênero *Vibrio* que se instalam quando o
93 animal se encontra imunodeprimido (Ligthner, 1996).

94 A administração de antimicrobianos, visando prevenir ou tratar os camarões
95 enfermos, encontra-se bastante disseminada, sendo um dos compostos de uso mais
96 comum a oxitetraciclina (OTC), por apresentar eficiência contra bactérias Gram-
97 negativas e positivas e baixa toxicidade (Oka et al., 2000; Uno et al., 2006). A OTC é
98 citada como um dos antibióticos mais utilizados na carcinicultura (Lyle-Fritch et al.,

99 2006) e os efeitos tóxicos da droga para os humanos podem incluir desde irritações
100 gastrintestinais, pancreatite, diarreia, alterações no fígado e nos rins, escurecimento
101 dos dentes e deposição nos ossos, porém raramente foi observada anafilaxia
102 (Brunton, 2006).

103 Diante das exigências quanto à segurança dos alimentos de origem animal
104 dos mercados consumidores e do possível uso de medicamentos veterinários na
105 carcinicultura, foram estabelecidos no Brasil programas e normas com o objetivo de
106 fiscalizar a utilização de substâncias danosas à saúde humana (Brasil, 2003; Brasil,
107 2006; Brasil, 2008). O controle da qualidade dos alimentos por parte dos mercados
108 consumidores cada vez mais requer a utilização de métodos de ensaios validados
109 segundo padrões estabelecidos por órgãos competentes para a obtenção de
110 resultados confiáveis e rastreáveis e que utilizem técnicas analíticas reconhecidas.

111 O mercado europeu é o principal destino dos camarões produzidos no Brasil e
112 possui um dos mais rigorosos critérios de avaliação de produtos alimentícios. Do
113 total de alertas emitidos para alimentos pela União Européia em 2006, 20%
114 corresponderam a amostras de crustáceos (RASFF, 2006).

115 Sendo assim, objetivou-se validar uma metodologia para determinação de
116 OTC baseada na técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com
117 Detecção por Arranjos de Diodos (DAD) e verificar, utilizando o método validado, os
118 níveis de resíduo de OTC em camarões *in vivo*, contribuindo para a geração de um
119 produto de qualidade em relação aos níveis de resíduo da droga, o desenvolvimento
120 econômico e a sustentabilidade ambiental.

121

122

123

124 **2. Material e Métodos**

125

126 *2.1. Material*

127

128 Os solventes e reagentes utilizados nas análises cromatográficas foram grau
129 CLAE. A água utilizada no preparo das soluções foi ultra-pura (1,8 M Ω). Foram
130 utilizados padrões de referência da *United States Pharmacopeial* (USP, Estados
131 Unidos) de oxitetraciclina e tetraciclina para o preparo das soluções padrão, esta
132 última para padronização interna. Para a realização dos testes de validação foram
133 utilizados camarões isentos de OTC, analisados em laboratório, e adicionados de
134 OTC *in vitro* através da transferência de alíquotas de solução padrão.

135 Nos cultivos de camarões para análise de OTC *in vivo* utilizou-se ração
136 contendo 35% de proteína bruta (Purina, Brasil) adicionada de oxitetraciclina
137 comercial contendo 50% (m/m) de OTC base.

138

139 *2.2. Preparação da amostra e técnica de extração da OTC*

140

141 O método de análise de OTC foi baseado em Nogueira-Lima et al. (2006),
142 com modificações (Oliveira et al., 2007).

143 Das amostras de camarão foram separados o músculo e a carapaça. A
144 amostra de músculo para a validação foi homogeneizada em liquidificador industrial
145 de alta velocidade (METVISA, Brasil). As amostras de músculo e de carapaça
146 oriundas do experimento foram manualmente homogeneizadas em cadinhos de
147 porcelana.

148 A partir de 1,0 g de amostra homogeneizada com 10 mL de tampão McIlvaine
149 0,01 mol L⁻¹ de EDTA pH 4,0 em ultra-som (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) foi
150 iniciada a extração em fase líquida. A esta mistura foi adicionado 1 mL de ácido
151 tricloroacético 24% (v/v) para desproteinização. Após centrifugação (Centrífuga
152 Jouan B4i, França) a 9500 rpm por cinco minutos, o sobrenadante foi recolhido e o
153 material retido no fundo do tubo foi extraído novamente. Após união dos
154 sobrenadantes, foram adicionados 2 mL de n-hexano com posterior centrifugação a
155 4000 rpm por 5 minutos. A fase lipídica ou superior foi descartada e a fase aquosa
156 aplicada em cartucho polimérico de 3 mL contendo 200 mg de estireno-divinil
157 benzeno (Phenomenex, Estados Unidos) para limpeza em fase sólida. A evaporação
158 do eluato (Evaporador rotativo Büchi R-200, Itália) ocorreu a 40°C por 10 minutos e
159 a reconstituição do resíduo seco foi realizada em 1 mL de ácido oxálico 0,01 mol L⁻¹
160 com posterior agitação em vórtex (Phoenix AP 56, Brasil) por um minuto. O extrato
161 final foi filtrado em membrana de 0,22 µm acoplada a uma seringa de 1 mL, sendo
162 coletado para posterior análise empregando a CLAE.

163

164 *2.3. Condições cromatográficas do CLAE*

165

166 As análises de OTC foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta
167 eficiência acoplado com DAD (Agilent Technologies série 1100, Estados Unidos)
168 composto de bomba quaternária de alta pressão (G1311A), degaseificador
169 (G1322A), forno (G1316A), detector com arranjo de diodos (G1315A) e auto-injetor
170 (G1313A). Para separação dos componentes da amostra foi utilizada uma coluna
171 em C 18 (Phenomenex, 250 x 4,0 mm, 5 µm). Foram estabelecidos volume de

172 injeção de 50 μL , detecção a 365 nm e fase móvel composta por ácido oxálico 0,01
173 mol L^{-1} , acetonitrila e metanol (75:14:11, v/v/v) a um fluxo de 1 mL min^{-1} .

174

175 2.4. Validação da metodologia de análise

176

177 O método proposto para determinação de OTC em camarão foi validado
178 segundo o guia do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade
179 Industrial (INMETRO, 2007) onde constam orientações sobre validação de métodos
180 de ensaios químicos. Foram estabelecidos a seletividade do método, o tempo de
181 retenção, a linearidade (coeficiente de correlação), a faixa de trabalho, a
182 recuperação relativa (por padronização interna) e os limites de detecção e
183 quantificação do método (LDM e LQM, respectivamente) e repetitividade.

184

185 2.5. Experimento “in vivo”

186

187 Os cultivos de camarão foram desenvolvidos na Estação Experimental
188 Professor Johei Koike da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)
189 (Pernambuco, Brasil) no período de novembro de 2007 a janeiro de 2008.

190 Camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei* pesando $4,45 \pm 0,94$ g,
191 provenientes de uma fazenda do litoral Norte do Estado de Pernambuco, foram
192 aclimatados por 30 dias em tanques de fibra de vidro de 500 L contendo água
193 marinha tratada (filtrada, clorada e declorada). Os animais foram distribuídos
194 aleatoriamente em oito tanques na densidade de 28 camarões por tanque,
195 cultivados em sistema fechado com aeração constante. A reposição da água foi
196 realizada de acordo com a evaporação.

197 Os tratamentos, em duplicata, se diferenciaram pela quantidade de OTC
198 administrada na ração no período de 14 dias, a adição da OTC na ração foi
199 realizada de acordo com o procedimento utilizado por Brock e Main (1994). As
200 baixas concentrações de OTC definidas para os tratamentos visaram avaliar o limite
201 de detecção encontrado para o método. Foram utilizadas as concentrações de 200,
202 400 e 500 $\mu\text{g g}^{-1}$, além do controle sem a droga (testemunha). Três camarões foram
203 coletados de cada tanque nos 1^o, 5^o, 10^o, 13^o, 16^o, 19^o e 22^o dia após o término do
204 fornecimento do antibiótico. O músculo e a carapaça dos animais foram separados
205 cuidadosamente, embalados com papel alumínio e congelados a -20°C para
206 avaliação do tempo de depleção da droga.

207 Amostras de água e hepatopâncreas foram coletadas e realizadas contagens
208 de *Vibrio* spp de acordo com o método citado por Silva et al. (1997) com o intuito de
209 verificar a interferência do antibiótico na população destas bactérias.

210 A temperatura e o oxigênio dissolvido (Oxímetro YSI Incorporation 550A,
211 Estados Unidos), a salinidade (Refratômetro Atago S-10E, Estados Unidos) e o pH
212 (pHmetro digital Homis 1002PH, Brasil) da água dos tanques foram analisados
213 diariamente durante todo o cultivo.

214

215 2.6. Ração

216

217 A ração foi fornecida a uma taxa de aproximadamente 4% da biomassa por
218 dia, dividida em duas alimentações às 8:00 e 16:00 horas. A ração adicionada de
219 OTC a 200, 400 e 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ foi mantida refrigerada, sendo a concentração de OTC
220 fornecida para cada tratamento de aproximadamente 8, 16 e 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ de biomassa
221 de camarão por dia, respectivamente.

222 *2.7. Análise estatística*

223

224 Diferenças entre médias foram verificadas utilizando-se o teste de Tukey com
225 um nível de significância de $P < 0,05$. Foi utilizada regressão linear nos resultados
226 obtidos nas análises de OTC na carapaça. Nos testes de validação foram seguidas
227 as recomendações do guia do INMETRO (2007).

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247 3. Resultados

248

249 3.1. Metodologia e validação

250

251 Os cromatogramas obtidos para solução padrão a $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A), músculo
252 do camarão fortificado a $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (B) e músculo de camarão isento de OTC (C)
253 encontram-se apresentados na Figura 1. Na Figura 2 encontram-se cromatogramas
254 para carapaça com OTC (A) e para carapaça isenta de OTC (B).

255 Foram definidos o tempo de retenção da OTC de 6,9 minutos, o coeficiente de
256 correlação linear de 0,9998 para OTC em solução na faixa de trabalho de 0,02 a 0,4
257 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o coeficiente de correlação de 0,9997 para OTC no extrato da matriz na
258 faixa de trabalho de 0,02 a $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$, a recuperação relativa de $106,0 \pm 17,1\%$ a um
259 nível de fortificação de $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$, a repetitividade como coeficiente de variação de
260 16,1% e os Limites de Detecção (LDM) e Quantificação do Método (LQM) de 0,006 e
261 $0,019 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. O método apresentou-se seletivo, não havendo
262 interferentes da matriz no tempo de retenção do analito (Figura 1).

263

264 3.2. Eliminação de resíduo de OTC no músculo e na carapaça

265

266 Não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre as médias de concentração
267 de OTC obtidas no músculo em todos os tratamentos e estas se apresentaram
268 abaixo do Limite Máximo de Resíduo (LMR), que para a OTC é de $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (EMEA,
269 1990), no primeiro dia após a administração da droga. O tempo de depleção da OTC
270 no músculo, em todos os tratamentos, foi verificado no quinto dia após o término da
271 medicação, ou seja, na segunda coleta o LDM de $0,019 \mu\text{g g}^{-1}$ foi atingido. No

272 entanto, na carapaça, somente no décimo terceiro dia após o fim do tratamento a
273 OTC não mais foi detectadaora (Tabela 1, Figura 3), porém as médias dos
274 resultados entre os tratamentos não se apresentem estatisticamente diferentes ($P \geq$
275 0,05). As concentrações de OTC na carapaça dos camarões de todos os
276 tratamentos permaneceram abaixo do LMR no quinto dia após suspensão do
277 fornecimento da droga.

278

279 3.3. *Parâmetros de cultivo*

280

281 As médias e os intervalos de confiança ($\bar{X} \pm SD$) para temperatura,
282 salinidade, pH e oxigênio dissolvido foram de $30,54 \pm 2,78$ °C, $30,18 \pm 0,61$ g L⁻¹,
283 $8,36 \pm 0,34$ e $5,75 \pm 0,82$ mg L⁻¹, respectivamente. As médias entre os tratamentos,
284 para todos os parâmetros avaliados, não apresentaram diferença estatística,
285 utilizando-se o teste de Tukey com nível de significância de 5,0 %. Não houve
286 diferença estatística significativa ($P \geq 0,05$) entre os tratamentos para as contagens
287 de *Vibrio* spp na água e no hepatopâncreas, no entanto os valores máximos de
288 contagem foram observados no hepatopâncreas.

289

290

291

292

293

294

295

296

297 4. Discussão

298

299 A OTC é utilizada na aquicultura para combater enfermidades e, devido a isto,
300 metodologias eficientes e que apresentem um limite de detecção abaixo do LMR
301 estabelecido para a droga são necessárias.

302 O LDM e o LQM encontrados para OTC por meio do método de Nogueira-
303 Lima et al. (2006) modificado foram inferiores ao LMR de $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ para OTC
304 estabelecido pela União Européia em músculo de camarão (EMEA, 1990) e ao LDM
305 de $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ estabelecido no método original. O limite obtido neste trabalho foi
306 também inferior aos apresentados por diversos autores que utilizaram a CLAE-DAD
307 para a determinação de OTC em camarão de várias espécies os quais variaram de
308 $0,008 \mu\text{g g}^{-1}$ a $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ (Uno, 2004; Reed et al., 2004 ; Reed et al., 2006 ; Uno et
309 al., 2006 ; Froongsarng et al., 2007 ; Gomez-Jimenez et al., 2008).

310 A recuperação relativa e o coeficiente de variação (CV) calculado no nível de
311 concentração de $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ foram aceitáveis de acordo com os critérios do Codex
312 Alimentarius (2003) que estabelece uma faixa de 70 a 110% para recuperação e de
313 até 20% para o CV. A recuperação obtida com as modificações realizadas foi maior
314 que a definida no método original de Nogueira-Lima et al. (2006) que era de $81,68 \pm$
315 $1,54\%$. Os coeficientes de correlação linear para OTC em solução e no extrato da
316 matriz fortificado foram considerados satisfatórios pelo critério de aceitação de $r >$
317 $0,90$, estabelecido pelo INMETRO (2007).

318 Lightner et al. (1996) relataram que para o controle efetivo de vibrioses em
319 camarões da espécie *Penaeus japonicus* foi necessário o fornecimento de OTC de
320 45 a $150 \mu\text{g g}^{-1}$ de biomassa de camarão. Neste trabalho foram delineados
321 tratamentos com baixos níveis, sendo fornecidas concentrações de 8 , 16 e $20 \mu\text{g g}^{-1}$

322 de biomassa e, através da análise da ração, estas foram confirmadas apresentando
323 os níveis de 200, 400 e 500 $\mu\text{g OTC g}^{-1}$. Estas baixas dosagens foram necessárias
324 para comprovar, utilizando animais obtidos *in vivo*, que o limite de detecção obtido
325 para o método atende aos requisitos estabelecidos.

326 Os resultados bacteriológicos obtidos são pertinentes com o pouco ou nulo
327 efeito da droga devido às baixas concentrações estabelecidas, pois não foi
328 verificada diferença estatística entre os tratamentos. Não existiu relação entre o
329 número de bactérias das amostras de água e hepatopâncreas e a concentração de
330 OTC no músculo e na carapaça. No entanto, observou-se que o número de vírios
331 no hepatopâncreas foi, em média, superior ao verificado na água.

332 O uso de antibióticos na aquicultura deve ser devidamente controlado, pois a
333 desinformação e a negligência podem originar o uso tanto de subdosagens, como
334 também de superdosagens. Ambas as situações podem induzir a resistência
335 bacteriana (Mendes et al., 2004). Subdosagens administradas podem levar a uma
336 rápida propagação de genes com resistência a múltiplos antibióticos (Moriarty,
337 2006), com a possibilidade de transferência de plasmídios de resistência entre
338 espécies provenientes do ambiente aquático e o homem, segundo Rhodes et al.
339 (2000).

340 Vários autores afirmaram a necessidade de controlar a utilização de
341 fármacos, aditivos e fertilizantes na aquicultura, pois este descontrole pode afetar os
342 ecossistemas marinhos e costeiros e também a saúde humana (Holmström et al.,
343 2003; Lalumera et al., 2004; Xuan Le et al., 2005; Christensen et al., 2006; Lyle-fritch
344 et al., 2006).

345 Para o controle do uso drogas é extremamente necessário se conhecer o
346 tempo de depleção. No caso da OTC, verificou-se neste trabalho que esse tempo foi

347 menor no músculo (cinco dias) que na carapaça (13 dias) em todos os tratamentos.
348 Este menor tempo de depleção da droga pode estar associado com a baixa
349 concentração de OTC administrada na ração, pois Nogueira-Lima et al. (2006) ao
350 submeterem camarões a um tratamento a $4500 \mu\text{g g}^{-1}$ de OTC na ração por 14 dias
351 em tanques, observaram que apenas no 25º dia após suspensão do tratamento a
352 concentração de OTC no músculo diminuiu para $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$. Gómez-Jimenez et al.
353 (2008) definiram um período de 10 dias após o término do tratamento com OTC a
354 $5000 \mu\text{g g}^{-1}$ na ração por 14 dias para que o nível de OTC no músculo de *L.*
355 *vannamei* diminuísse para $0,01 \mu\text{g g}^{-1}$.

356 Segundo Uno (2004), a carapaça dos camarões é um importante lugar para
357 distribuição da OTC. Bray et al. (2006), utilizando concentrações de OTC entre 4500
358 e $22500 \mu\text{g g}^{-1}$ na ração observaram que a interrupção do crescimento do
359 exoesqueleto poderia estar associada à formação primária de cálcio e magnésio,
360 pois de acordo com Arias et al. (2007), a OTC apresenta a propriedade de formar
361 complexos metálicos com cátions divalentes por ser uma molécula receptora de
362 elétrons. A carapaça dos camarões é formada de 15 a 20% de quitina, 25 a 40% de
363 proteínas e de 40 a 55% de sais inorgânicos, principalmente o carbonato de cálcio,
364 um íon divalente (Marthur e Narang, 1990). Os grupos acetamidas da quitina se
365 ligam aos cátions metálicos (sais), formando assim a carapaça.

366 Processos que envolvem aumento de temperatura, como o cozimento,
367 diminuem em apenas 20% os níveis de OTC em amostras de carapaça. Em
368 amostras cruas, a OTC é acumulada e retida formando complexos metálicos, o que
369 dificulta a remoção da droga em estruturas desta natureza. No entanto, em amostras
370 de músculo, até 80% da OTC é eliminada quando submetidas ao mesmo
371 procedimento (Uno et al., 2006).

372 Diante do exposto, recomenda-se avaliar a concentração de OTC no camarão
373 inteiro e não somente no músculo, como determinado por órgãos regulamentadores
374 como a Comunidade Européia e a *Food and Drug Administration* (FDA), que
375 estipularam os limites de 0,1 e 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ para OTC em tecidos animais,
376 respectivamente (EMEA, 1990; Codex Alimentarius, 2006).

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397 5. Conclusão

398

399 O método definido e validado atende ao uso pretendido, por apresentar um
400 dos mais baixos limites de detecção definidos para métodos que empregam a CLAE-
401 DAD; Os coeficientes de correlação para OTC em solução e no extrato da matriz
402 fortificado, faixa de trabalho, recuperação relativa e repetitividade são satisfatórios
403 de acordo com as normas vigentes. O acúmulo de resíduo de OTC, quando
404 administrada na ração, é maior na carapaça que no músculo devido sobretudo à
405 composição estrutural da carapaça.

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422 Agradecimentos

423

424 Agradecimentos à Universidade Federal Rural de Pernambuco por toda
425 estrutura física, de pessoal e formação acadêmica, ao Conselho Nacional de
426 Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), à Agência Financiadora de Estudos (FINEP),
427 ao Instituto de Tecnologia de Pernambuco pela oportunidade de desenvolver este
428 trabalho no Laboratório de Contaminantes Químicos e Biológicos (LEMI).
429 Agradecimentos pelo apoio técnico ao Engenheiro de Pesca Pedro Duque e à
430 Médica Veterinária Suely Santos Bezerra.

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447 **Referências**

- 448 Arias, M., Garcia-Falcón, M.S., Garcia-Rio, L., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R., Simal-
449 Gándara, J., 2007. Binding constants of oxytetracycline to animal feed divalents
450 cations. *J. Food Eng.* 78, 69-73.
- 451 Barbieri Jr, R.C., Ostrensky Neto, A., 2002. Camarões marinhos-engorda. Aprenda
452 Fácil, Viçosa, 370 pp.
- 453 BRASIL, 2001. Plataforma tecnológica do camarão marinho cultivado. Ministério da
454 Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. Brasília, 276 pp.
- 455 BRASIL, 2003. Resolução RDC nº 253, 16/09/2003. Ministério da Saúde. [www.
456 elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=8128&word=pamvet](http://www.elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=8128&word=pamvet).
- 457 BRASIL, 2006. Portaria nº 50, 20/02/2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e
458 Abastecimento [www.extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/
consultarLegislacao](http://www.extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao).
- 459 BRASIL, 2008. Instrução Normativa nº 10, 14/04/2008. Ministério da Agricultura,
460 Agropecuária e Abastecimento. [www.extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/
461 consultarLegislacao](http://www.extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao).
- 462 Bray, W.A., Williams, R.R., Lightner, D.V., Lawrence, A.L., 2006. Growth, survival
463 and histological responses of the marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to three
464 dosage levels of oxytetracycline. *Aquaculture* 258, 97–108.
- 465 Brock, J. A.; Main, K. L. 1994. A guide to the common problems and diseases of
466 cultured *Penaeus vannamei*. The oceanic institute, Makapuu Point. 241 pp.
- 467 Brunton L., 2006. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics.
468 11th ed, McGraw-Hill, New York, 1984 pp.
- 469 Christensen, A.M., Ingerslev, F., Baun, A., 2006. Ecotoxicity of mixtures of antibiotics
470 used in aquacultures. *Environ. Tox. Chemistry* 8 (25), 2208-2215.
- 471 Codex Alimentarius, 2003. Revisión de los criterios basados en el rendimientos de
472 los metodos de análisis para los residuos de medicamentos veterinarios en los
473 alimentos. Codex Alimentarius, Roma, 23 pp.
- 474 Codex Alimentarius, 2006. Límites máximos de residuos para medicamentos en los
475 alimentos. Codex Alimentarius, Roma, 32 pp.
- 476 EMEA, 1990. Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a
477 Community procedure for the establishment of maximum residue limits for veterinary
478 medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal* 224
479 18/08/1990, http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol5_en.htm
- 480 FAO, 2008. Fisheries and aquaculture department: statistics and information. FAO,
481 Rome, www.fao.org/fishery.
- 482 Faroongsarng, D., Chandumpai, A., Chiayvareesajja, S., Theapparatt, Y., 2007.
483 Bioavailability and absorption analysis of oxytetracycline orally administered to the
484 standardized moulting farmed Pacific white shrimps (*Penaeus vannamei*).
485 *Aquaculture* 269, 89–97.
- 486 Gomez-Jimenez, S., Espinosa-Plascencia, A., Valenzuela-Villa, F., Bermudez-
487 Almada, M.C., 2008. Oxytetracycline (OTC) accumulation and elimination in
488 hemolymph, muscle and hepatopancreas of white shrimp *Litopenaeus vannamei*
489 following an OTC-feed therapeutic treatment. *Aquaculture* 274, 24-29.
- 490 Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Pongshompoo, S., Bengtsson, E.,
491 Kautsky, N., 2003. Antibiotic use in shrimp farming and implications for
492 environmental impacts and human health. *Int. J. Food Sci. Technol.* 38, 255–266.

- 493 Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO),
494 2007. Orientações sobre Validação de Métodos. 2ª Revisão, Brasília, 25 pp.
- 495 Lalumera, G.M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G., Fanelli, R. 2004.
496 Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics
497 used in aquaculture in Italy. *Chemosphere* 54, 661-668.
- 498 Lightner, D.V., 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for
499 diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society. Baton Rouge,
500 Louisiana, 304 pp.
- 501 Lyle-Fritch, L.P., Romero-Beltrán, E., Páez-Osuna, F., 2006. A survey on use of
502 chemical and biological products for shrimp farming in Sinaloa (NW Mexico).
503 *Aquacult. Eng.* 35, 103-146.
- 504 Marthur, N.K., Narang, C.K., 1990. Chitin and Chitosan, Versatiles polysaccharides
505 from marine animals. *J. Chem. Educ.* 67, 938.
- 506 Mendes, E.S., Alves, C.A.B., Bezerra, S.S., Mendes, P.P., Santos, F.L., 2004.
507 Sensibilidade in vitro à enrofloxacin e oxitetraciclina de vibrios isolados na
508 larvicultura de camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*). *Revista ciência veterinária*
509 nos trópicos 7 (2, 3), 90-97.
- 510 Moriarty, D.J.W., 2006. Os perigos do uso de antibióticos na aquacultura. [http://](http://www.aqualider.com.br/article.php?recid=88)
511 www.aqualider.com.br/article.php?recid=88.
- 512 Nogueira-Lima, A.C., Gesteira, T.C.V., Mafezoli, J., 2006. Oxytetracycline residues
513 in cultivated marine shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) (Crustacea,
514 Decapoda) submitted to antibiotic treatment. *Aquaculture* 254, 748–757.
- 515 Oka, H., Ito, Y., Matsumoto, H., 2000. Chromatographic analysis of tetracycline
516 antibiotics in foods – Review. *J. Chromatogr. A* 882, 109–133.
- 517 Oliveira, B.R.B., Mendes, E.S., Neves, C.C.L. 2007. Método para análise de
518 oxitetraciclina em camarão (*Litopenaeus vannamei*, boone 1931) por CLAE-UV.
519 Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, Manaus.
- 520 Rapid Alert System for Food And Feed (RASFF) Annual Report, 2006. Office for
521 Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 40 pp.
- 522 Reed, L.A., Siewicki, T.C., Shah, J.C., 2004. Pharmacokinetics of oxytetracycline in
523 the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*. *Aquaculture* 232, 11–28.
- 524 Reed, L.A., Siewicki, T.C., Shah, J.C., 2006. The biopharmaceutics and oral
525 bioavailability of two forms of oxytetracycline to the white shrimp, *Litopenaeus*
526 *setiferus*. *Aquaculture*, 258, 42–54.
- 527 Rhodes, G., Huys, G., Swings, J., 2000. Distribution of oxytetracycline resistance
528 plasmids between Aeromonads in hospital and aquaculture environments:
529 Implications of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinante.
530 *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3883–3890.
- 531 Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., 1997. Manual de métodos de análises
532 microbiológicas em alimentos. Varela, São Paulo, 230 pp.
- 533 Uno, K., 2004. Pharmacokinetics of oxolinic acid and oxytetracycline in Kuruma
534 shrimp *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 230, 1-11.
- 535 Uno, K., Aoki, T., Kleechaya, W., Tanasomwang, V., Ruangpan, L., 2006.
536 Pharmacokinetics of oxytetracycline in black tigre shrimp, *Penaeus monodon*, and
537 the effect of cooking on the residues. *Aquaculture* 254, 24-31.
- 538 Xuan Le, T., Munekegeb, Y., Shin-Ichiro, K., 2005. Antibiotic resistance in bacteria
539 from shrimp farming in mangrove areas. *Sci. Total Environ.* 349, 95-105.

540 **Legendas das figuras**

541

542 **Figura 1.** Cromatogramas para OTC: (A) solução padrão de OTC a $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, (B)
543 extrato do músculo do camarão fortificado a $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ de OTC e (C) extrato do
544 músculo de camarão isento de OTC.

545

546 **Figura 2.** Cromatogramas para carapaça isenta de OTC (A) e para carapaça com
547 OTC (B).

548

549 **Figura 3.** Níveis de resíduo de OTC na carapaça nos diferentes tratamentos.

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565
 566
 567
 568
 569
 570
 571
 572
 573
 574
 575
 576
 577
 578
 579
 580
 581
 582
 583
 584
 585
 586
 587
 588
 589

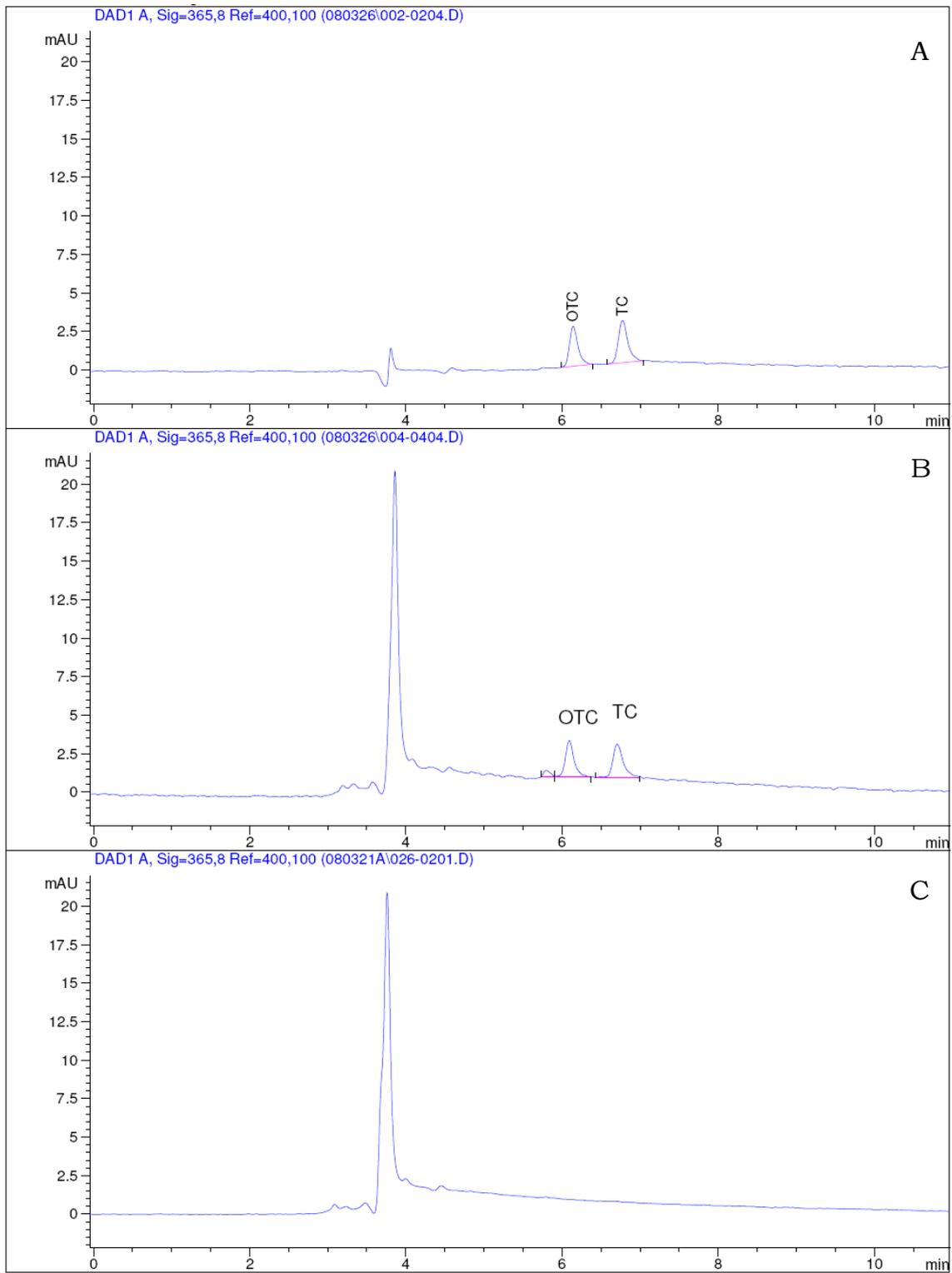


Figura 1

590
 591
 592
 593
 594
 595
 596
 597
 598
 599
 600
 601
 602
 603
 604
 605
 606
 607
 608
 609
 610
 611
 612
 613
 614

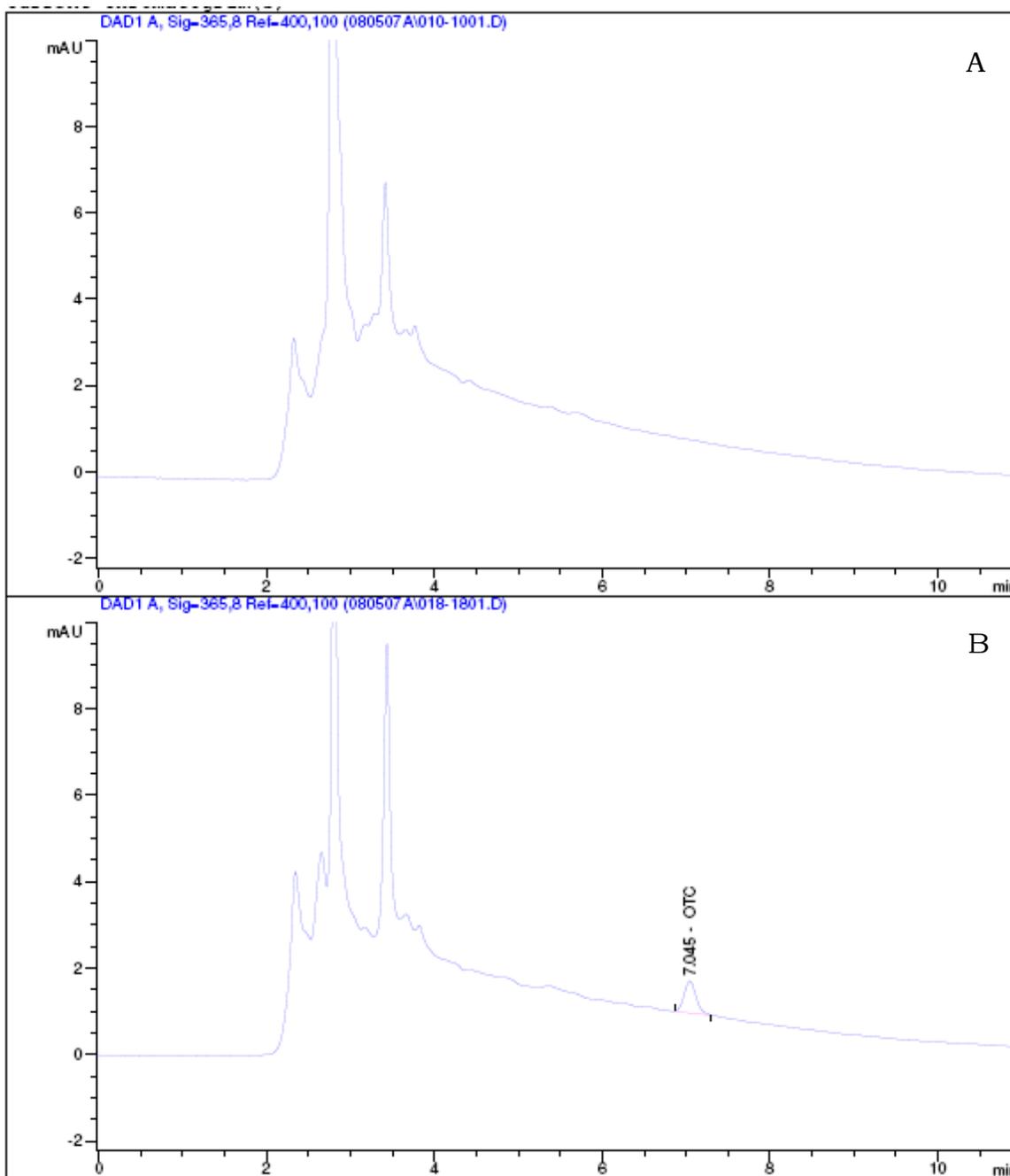


Figura 2

615
 616
 617
 618
 619
 620
 621
 622
 623
 624
 625
 626
 627
 628
 629
 630
 631
 632
 633
 634
 635
 636
 637
 638
 639

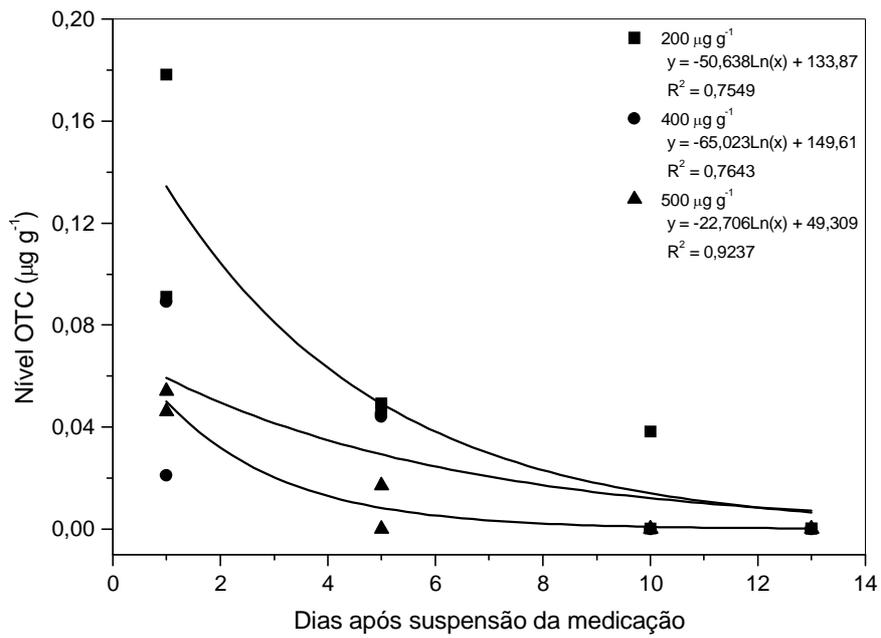


Figura 3

640 **Legenda das tabelas**

641 **Tabela 1.** Tempo de depleção da OTC.

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

Dia após a medicação	Tratamentos ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
	200		400		500	
	Músculo	Carapaça	Músculo	Carapaça	Músculo	Carapaça
1º	0,028 \pm 0,006	0,14 \pm 0,06	0,037 \pm 0,007	0,15 \pm 0,09	0,014 \pm 0,004	0,051 \pm 0,006
5º	ND	0,049 \pm 0,001	ND	0,045 \pm 0,001	ND	0,017 \pm 0,007
10º	ND	0,019 \pm 0,007	ND	ND	ND	ND
13º	ND	ND	ND	ND	ND	ND

666 N = 4: ND = não detectável

667 **Tabela 1**

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método definido e validado atende aos requisitos estabelecidos pelo guia do INMETRO para validação de ensaios químicos e apresenta um dos mais baixos limites de detecção para métodos que empregam a CLAE com detecção por arranjo de diodos. Ao se avaliar o tempo de depleção da OTC no músculo e carapaça de camarões cultivados submetidos aos tratamentos com OTC, verifica-se que o acúmulo de resíduo de OTC na carapaça é maior que o do músculo e que é necessário rever as normas de controle de resíduo de OTC em camarões. A contagem de *Vibrio* spp é maior para o hepatopâncreas que para a água, porém não se obteve relação entre estes parâmetros. São necessários maiores estudos que forneçam informações acerca dos níveis de resíduos de antibióticos em alimentos, assim como no ambiente.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, T. J.; MANLEY, R.; PALANIAPPAN, R.; DHEVENDARAN, K. Pathogenicity and antibiotic sensitivity of luminous *Vibrio harveyi* isolated from diseased penaeid shrimp. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 12, p. 1-8, 1997.

AGUIRRE-GUZMAN, G.; RUIZ, H. M.; ASCENCIO, F. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. **Aquaculture Research**, v. 35, p. 1395-1404, 2004.

ALIABADI, F. S.; LEES, P. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimization, **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, p. 307-313, 2000.

ANDERSON, I.G.; SHAMSUDIN, M.N.; SHARIFF, M.; NASH, G. Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds. **Asian Fisheries Science**, v. 2, p. 93-108, 1988.

ANDERSON, C. R.; RUPP, H. S.; WU, W. Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography, **Journal of Chromatography A**, n. 1075, p. 23-32, 2005.

ARIAS, M., GARCIA-FALCÓN, M.S., GARCIA-RIO, L., MEJUTO, J.C., RIAL-OTERO, R., SIMAL-GÁNDARA, J. Binding constants of oxytetracycline to animal feed divalents cations. **Journal of Food Engineering**, n. 78, p. 69-73, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO (ABCC). **Código de conduta e de boas práticas de manejo e de fabricação para uma carcinicultura ambientalmente sustentável e socialmente justa**. Recife: ABCC, 1ª ed., 2005a. 86p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO (ABCC). **Programa de biossegurança para fazendas de camarão marinho**. Recife: ABCC, 1ª ed., 2005b. 61p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO (ABCC). Mercado interno se revigora. **Revista da ABCC**, n. 1, p. 30-31, 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC INTERNATIONAL). Chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline in edible animals tissues: Liquid chromatographic method. In: AOAC. **Official Method of Analysis of AOAC International**. Gaithersburg: AOAC International, 1995. Chapter 23, p. 19-23.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC INTERNATIONAL). Oxytetracycline in feeds. In: AOAC. **Official Method of Analysis of AOAC International**. Gaithersburg: AOAC International, 2000. Chapter 5, p.56.

BARBIERI, R. C. J.; OSTRENSKY, A. N. **Camarões marinhos. Reprodução, maturação e larvicultura**. Viçosa: Aprenda Fácil. p. 81-99. 2001.

BARBIERI, R. C. J.; OSTRENSKY, A. N. **Camarões marinhos – engorda**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. 370 p.

BARROS, C. B. Princípios da validação de métodos analíticos. Disponível em: <<http://www.cpti.com.br/artigos.htm>>. Acesso em: 01 ago. 2006.

BOWER, S. M. *Vibrio* spp. (Vibrio disease) of cultured shrimp. In: SYNOPSIS OF INFECTIOUS DISEASES AND PARASITES OF COMMERCIALY EXPLOITED SHELLFISH. 1997. Disponível em: <<http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/vibriasp-e.htm>>. Acesso em: 15 jul. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 193**, de maio de 1998. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>>. Acesso em: 01 ago. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento, Departamento de Pesca e Aquicultura. **Plataforma tecnológica do camarão marinho cultivado**. BRASIL, Brasília, 2001. 276 p.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 253**, de 16 de setembro de 2003. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=8128&word=pamvet>>. Acesso em: 01 ago. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 50**, de fevereiro de 2006. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>>. Acesso em: 01 ago. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº10**, de março de 2008. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>>. Acesso em: 01 ago. 2008.

BRAY, W. A.; WILLIAMS, R. R.; LIGHTNER, D. V.; LAWRENCE, A. L. Growth, survival and histological responses of the marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to three dosage levels of oxytetracycline. **Aquaculture**, v. 258, p. 97-108, 2006.

BRILLANTES, S.; TANASOMWANG, V.; THONGROD, S.; DACHANANTAWITAYA, N. Oxytetracycline Residues in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **J. Agriculture Food Chemistry**, v. 49, p. 4995-4999, 2001.

BROCK, J. A.; MAIN, K. L. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. **The oceanic institute**, Makapuu Point. 1994. 241 p.

BRUNTON L. **Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11th ed, New York: McGraw-Hill, 2006. 1984 p.

CARVALHO, R. A. P. L. F. Inocuidade do Camarão Cultivado – Responsabilidades das fazendas. **Revista da ABCC**, n. 3, p. 60-64, 2004.

CHEN, C.; GU, X. Determination of tetracycline residues in bovine milk, serum and urine by capillary electrophoresis. **Journal of AOAC International**, n.76, p. 1369–1377, 1995.

CHRISTENSEN, A. M.; INGERSLEV, F.; BAUN, A. Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures, **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 2208-2215, 2006

CODEX ALIMENTARIUS. **Revisión de los criterios basados en el rendimientos de los metodos de análisis para los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos**. Roma: Codex Alimentarius, Nov., 2003. 23 pp.

CODEX ALIMENTARIUS. **Limites máximos de resíduos para medicamentos en los alimentos**. Roma: Codex Alimentarius, julio, 2006. 32 p.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. 456 p.

COUTO, C. M. C. M.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; REIS, S. Complexação da tetraciclina, da oxitetraciclina e da clortetraciclina com o cátion cobre: estudo potenciométrico. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 457-460, 2000.

CRUZ-LACIERDA, E. R.; DELA PENA, L. LUMANLAN-MAYO, S. The use of chemicals in aquaculture in the Philippines. In: ARTHUR, J.R.; LAVILLA-PITOGO, C.R.; SUBASINGHE, R.P. (Eds.). **Use of chemicals in aquaculture in Ásia**. Iloilo, Philippines, 2000. p.155-184.

DIETZE, J. E.; SCRIBNER, E. Occurrence of antibiotics in water from 13 fish hatcheries, 2001–2003, **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 85, n. 15, p. 1141-1152, 2005.

EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS. Unofficial Consolidated Version of the Annexes I to IV of Council Regulations EEC No. 2377, de 26 jun.1990.

FAROONGSARNG, D.; CHANDUMPAI, A.; CHIAYVAREESAJJA, S.; THEAPPARAT, Y. Bioavailability and absorption analysis of oxytetracycline orally administered to the standardized moulting farmed Pacific white shrimps (*Penaeus vannamei*), **Aquaculture**, v. 269, p. 89–97, 2007.

FERNANDEZ-GONZÁLEZ, R.; GARCIA-FALCÓN, M. S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Quantitative analysis for oxytetracycline in medicated premixes and feeds by second-derivative synchronous spectrofluorimetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 455, p. 143-148, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), FishStat, 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 08 feb. 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Aquaculture drugs, Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide. In. FDA. 2 ed. Washington: FDA, 1998. cap. 22.

FRELIER, P.F.; SIS, R.F.; BELL, T.A.; LEWIS, D.H. Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Texas cultured shrimp (*Penaeus vannamei*). **Veterinarian Pathology**, n. 29, p. 269–277. 1992.

GESTEIRA, T.C.V. Enfermidades infecciosas registradas na carcinicultura brasileira. In: SILVA-SOUZA, A.T. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Maringá: ABRAPOA, 2006. p. 137-158.

GÓMEZ-JIMENEZ, S.; ESPINOSA-PLASCENCIA, A.; VALENZUELA-VILLA, F.; BERMÚDEZ-ALMADA, M. C. Oxytetracycline (OTC) accumulation and elimination in hemolymph, muscle and hepatopancreas of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following an OTC-feed therapeutic treatment. **Aquaculture**, v. 274, p. 24-29, 2008.

HALLING-SORENSEN, B. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. **Chemosphere**, n. 40, p. 731- 739, 2000.

HALLING-SORENSEN, B.; HOLTEN LU TZHOFT, H. C.; ANDERSEN, H. R.; INGERSLEV, F. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 46, p. 53-58, 2000.

HERWIG, R. P.; GRAY, J. P.; WESTON, D. P. Antibacterial resistant bacteria in surficial sediments near salmon net-cage farms in Puget Sound, Washington. **Aquaculture**, v. 149, p. 263-283, 1997.

HOLMSTRÖM, K.; GRÄSLUND, S.; WAHLSTRÖM, A.; POUNGSHOMPOO, S.; BENGTSSON, E.; KAUTSKY, N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 38, p. 255-266, 2003.

HOLTEN-LUTZHOFT, H. C.; HALLING-SORENSEN, B.; JORGENSEN, S. E.; Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 36, n. 1, p.1-6, jan. 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, 2ª Revisão, 25p, 2007.

LALUMERA, G. M.; CALAMARI, D.; GALLI, P.; CASTIGLIONI, S.; CROSA, G.; FANELLI, R. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. **Chemosphere**, v. 54, p. 661-668, 2004.

LIGHTNER, D. V. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: J.P. McVey. CRC Handbook of mariculture. **Crustacean Aquaculture**, Baton Rouge: CRC Press. p. 239-320. 1983.

LIGHTNER, D. V. (ed.). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. **World Aquaculture Society**, Los Angeles: Baton Rouge, 1996. 304p.

LOY, J. K.; DEWHIRST, F. E.; WEBER, W.; FRELIER, P. F.; TEMPLETON, J. W. Molecular phylogeny and in situ detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 62, p. 3439-3445, 1996.

LYLE-FRITCH, L. P.; ROMERO-BELTRÁN, E.; PÁEZ-OSUNA, F. A survey on use of chemical and biological products for shrimp farming in Sinaloa (NW Mexico). **Aquacultural Engineering**, v. 35, p. 103-146, 2006.

MADHAVI, R.; JANAKIRAM P.; JAYASREE L.; MURTHY P. S. N. Occurrence of concurrent infections with multiple viruses in *Penaeus monodon* from culture ponds of north coastal Andhra Pradesh. **Current Science**, Columbus, v. 82, n. 11, 2002.

MARTHUR, N.K.; NARANG, C.K. Chitin and Chitosan, Versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemistry Education**, n. 67, p. 938, 1990.

MENDES, E. S.; ALVES, C. A. B.; BEZERRA, S. S.; MENDES, P. P.; SANTOS, F. L. Sensibilidade in vitro à enrofloxacin e oxitetraciclina de vibrios isolados na larvicultura de camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*). **Revista Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 7, n. 2 e 3, p. 90-97, mai/dez. 2004.

MERMOUD, I.; COSTA, R.; LIGHTNER, D.V. HAFNER, P.; MOUSSA, A.; FERRE, O. Study of episodes of mortality observed in reared *Penaeus stylirostris* since 1993. In: New Caledonia: Histological abnormalities observed in moribund shrimps

collected during episodes of mortality. In: AQUACULTURE, 1996, Bangkok. **Book of abstracts**...Bangkok: World Aquaculture Society, 1996. p.225.

MILLER, R.F.; SOKOLOSKI, T.D.; MITSCHER, L.A.; BONACCI, A.C.; HOENER, B.A. Use of circular dichroism in analysis of mixtures of tetracycline and 4-epitetracycline and its application to assay of commercial products. **Journal of Pharmaceutic Science**, n.62, v.7, p.1143-1147, 1973.

MOHNEY, L. L.; WILLIAMS, R. R.; BELL, T. A.; LIGHTNER, D. V. Residues of oxytetracycline in cultured juvenile blue shrimp, *Penaeus stylirostris* (Crustacea: Decapod) , fed medicated feed for 14 days. **Aquaculture**, v.149, p. 193-202, 1997.

MORIARTY, D. J. W. Os perigos do uso de antibióticos na aquicultura. Disponível em: <[http:// www.aqualider.com.br/article.php?recid=88](http://www.aqualider.com.br/article.php?recid=88)>. Acesso em: 20 jul. 2006.

NOGUEIRA-LIMA, A. C.; GESTEIRA, T. C. V.; MAFEZOLI, J. Oxytetracycline residues in cultivated marine shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) (Crustacea, Decapoda) submitted to antibiotic treatment. **Aquaculture**, v. 254, p. 748-757, 2006.

OKA, H.; ITO, Y.; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods – Review. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 109-133, 2000.

OLIVEIRA, B. R. B.; SANTOS, P. N.; MENDES, E. S.; NEVES, C. C. L. Validação de metodologia para determinação de oxitetraciclina por CLAE-UV: resultados preliminares. In. 14º ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 2007, João Pessoa. Resumos... João Pessoa: 2007. 1 CD-ROM

PENA, A.; PELANTOVA, N.; LINO, C.M.; SILVEIRA, M.I.N.; SOLICH, P. Validation of analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.53, p. 3784-3788, 2005.

RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED (RASFF) In. Office for Official Publications of the European Communities, 2006. Luxembourg. **Annual Report**... Luxembourg: 2007 - 40 p.

REED, L.; SIEWICKI, T.; SHAH, J. Pharmacokinetics of oxytetracycline in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*. **Aquaculture**, v. 232, p. 11-28, 2004.

REED, L.A.; SIEWICKI, T.C.; SHAH, J.C. The biopharmaceutics and oral bioavailability of two forms of oxytetracycline to the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, **Aquaculture**, v. 258, p. 42-54, 2006.

RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, J. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between *Aeromonads* in hospital and aquaculture environments: Implications of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinate. **Applied Environmental Microbiology**, n. 66, p. 3883-3890, 2000.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, set./out. 2004.

RIBEIRO, C. M. F. **Aspectos gerais da vibriose em camarão marinho**. Recife: FAFIRE, 2005. 40p.

RIGOS, G.; ALEXIS, M.; NENGAS, I. Leaching, palatability and digestibility of oxytetracycline and oxolinic acid included in diets fed to seabass *Dicentrarchus labrax* L. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 841-847, 1999.

RIGOS, G.; NENGAS, I.; ALEXIS, M. Oxytetracycline (OTC) uptake following bath treatment in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 261, p. 1151-1155, 2006.

ROCHA, I.P.; ROCHA, D.M. Carcinicultura: Produção, demanda e processo tecnológico com responsabilidade ambiental e compromisso social. **Revista da ABCC**, n. 1, p. 16-22, 2007.

RUANGPAN, I.; KITAO, T. Minimal inhibitory concentration of 19 chemotherapeutics against *Vibrio* bacteria of shrimp, *Penaeus monodon*. **Disease Asian Aquaculture**, v. 1, p. 135-142, 1992.

SAMPAIO, Y.; COSTA, E. Geração de empregos diretos e indiretos na cadeia produtiva do camarão cultivado. **Revista da ABCC**, n. 1, p. 60-64, 2003.

SANGRUNGRUANG, K.; CHOTCHUANG, A.; UENO, R. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in giant tiger prawn. **Fisheries Science**, n. 70, p. 467-472, 2004.

SCHNEIDER, M. J.; DARWISH, A. M.; FREEMAN, D. W. Simultaneous multiresidue determination of tetracyclines and fluoroquinolones in catfish muscle using high

performance liquid chromatography with fluorescence detection, **Analytica Chimica Acta**, v. 586, p. 269-274, 2007.

SHMIDT, A. S.; BRUUN, M. S.; DALSGAARD, I.; PEDERSEN, K.; LARSEN, J. L. Occurrence of antimicrobial resistance in fish - pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. **Applied Environmental Microbiology**, n. 66, p. 4908- 4915, 2000.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análises microbiológicas em alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 230 p.

TENDÊNCIA, E. A; DE LA PENA, L. D. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**, n. 195, p. 193-204, 2001.

TISON, D.L. *Vibrio*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. (eds.). **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society of Microbiology, 1999. p. 497-506.

TOURAKI, M.; RIGAS, P.; PERGANDAS, P.; KASTRITSIS, C. Determination of oxytetracycline in the live fish feed *Artemia* using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, n.663, p. 167-171, 1995.

UNITED STATES PHARMACOPEIAL (USP). Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 30 Ed., 2007. p. 2835.

UNO, K. Pharmacokinetics of oxolinic acid and oxytetracycline in Kuruma shrimp *Penaeus japonicus*, **Aquaculture**, v. 230, p. 1-11, 2004.

UNO, K.; AOKI, T.; KLEECHAYA, W.; TANASOMWANG, V.; RUANGPAN, L. Pharmacokinetics of oxytetracycline in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and the effect of cooking on the residues. **Aquaculture**, n. 254, p. 24-31, 2006.

VISUTHISMAJARN, P.; VITAYAVIRASUK, B.; LEERAPHANTE, N.; KIETPAWPAN, M. Ecological risk assessment of abandoned shrimp ponds in southern Thailand, **Environmental Monitoring and Assessment**, n. 104, p. 409-418, 2005.

WESTON, D.P. Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture. In: BAIRD, D.; BEVERIDGE, M.C.M.; KELLY, L.A.; MUIR, J.F. (eds).

Aquaculture and Water Resources Management. Oxford: Blackwell Science, 1996. p. 140-165.

WOLLENBERGER, L.; HALLING-SORENSEN, B.; KUSK, O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**, n. 40, p. 723-730, 2000.

XUAN LE, T.; MUNEKAGEB, Y.; SHIN-ICHIRO, K. Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. **Science of the Total Environment**, n. 349, p. 95-105, 2005.

ANEXO A - Normas da Revista *Aquaculture*



AQUACULTURE

An International Journal

Guide for Authors

Submission of manuscripts

Types of contribution

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. *Review Articles* can cover either narrow disciplinary subjects or broad issues requiring interdisciplinary discussion. They should provide objective critical evaluation of a defined subject. Reviews should not consist solely of a summary of published data. Evaluation of the quality of existing data, the status of knowledge, and the research required to advance knowledge of the subject are essential.

Short Communications are used to communicate results which represent a major breakthrough or startling new discovery and which should therefore be published quickly. They should not be used for preliminary results. Papers must contain sufficient data to establish that the research has achieved reliable and significant results. *Technical Papers* should present new methods and procedures for either research methodology or culture-related techniques. The *Letters to the Editor* section is intended to provide a forum for discussion of aquacultural science emanating from material published in the journal.

Elsevier reserves the privilege of returning the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Copyright

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all Authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Online submission to the journal prior to acceptance

Submission to **Aquaculture** proceeds totally on-line by way of an electronic submission system. By accessing the website <http://www.ees.elsevier.com/aqua> you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. When submitting a manuscript to Elsevier Editorial System, authors need to provide an electronic version of their manuscript. For editing purpose original source files, not PDF files, are required should the manuscript be accepted. The author should specify a category designation for the manuscript (full length article, review article, short communication, etc.), choose a set of classifications from the prescribed list provided online and select an editor. Once the uploading is complete, the system automatically generates an electronic FDF (can be read by PDF readers) proof, which is then used for reviewing. Authors may provide the names of three potential referees in their covering letter. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or journal procedures to the Editorial Office. They should avoid responding by messages received from the system using the 'Reply' button on their e-mail message; this will send the message to the system support and not to the editorial office, and will create unnecessary load of sorting out and forwarding. All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions, will be by e-mail.

Papers for consideration should be submitted via the website mentioned above to the appropriate Section Editor:

Nutrition:

R. P. Wilson

Husbandry and Management:

B.Costa-Pierce

Physiology and Endocrinology:

E.M. Donaldson

Diseases:

D.J. Alderman

Genetics:

G. Hulata

English language

Manuscripts should be written in English. Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review. Authors who require information about language editing and copy editing services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

Format requirements for accepted articles**General**

1. Manuscripts should be typewritten, with numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered in the upper right-hand corner. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

2. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and concise)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone and fax number and E-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3-6 items.

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

3. In typing the manuscript, titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use bold face, lower-case letter type for titles; use non-bold, italic letter type for sub-titles. Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ?), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross referencing: do not just refer to "the text".

4. Species names and other Latin terms should be typed in italics.

5. SI units should be used.

6. It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the word processor's facility. When preparing tables, if you are

using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/authors>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text. See also the section on Preparation of electronic illustrations.

LaTeX documents

The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsart", or alternatively the standard document class "article". The Elsevier LaTeX package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the files: elsart.cls, guidelines for users of elsart, a template file for quick start, and the instruction booklet "Preparing articles with LaTeX".

Abstracts

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words. It should provide a very brief introduction to the problem and a statement about the methods used in the study. This should generally be followed by a brief summary of results, including numerical data (means and standard errors, for example). The abstract should end with an indication of the significance of the results. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. References should therefore be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 4-6 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should be typewritten on a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics. Use the solidus (/) instead of a horizontal line, e.g., X/Y . Powers of e are often more conveniently denoted by \exp . Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text). Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} and not Ca^{++} . Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ^{18}O . The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g., phosphate as P_2O_5).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves on a separate sheet at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Preparation of electronic illustrations

General

1. Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
2. Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.

3. Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
4. Number the illustrations according to their sequence in the text.
5. Use a logical naming convention for your artwork files.
6. Provide all illustrations as separate files.
7. Provide captions to illustrations separately.
8. Produce images near to the desired size of the printed version.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics". TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required. DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

1. embed graphics in your word processor (spreadsheet, presentation) document;
2. supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
3. supply files that are too low in resolution;
4. submit graphics that are disproportionately large for the content.

Captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Linedrawings

The lettering and symbols, as well as other details, should have proportionate dimensions, so as not to become illegible or unclear after possible reduction; in general, the figures should be designed for a reduction factor of two to three. The degree of reduction will be determined by the Publisher. Illustrations will not be enlarged. Consider the page format of the journal when designing the illustrations. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs (halftones)

Remove non-essential areas of a photograph. Do not mount photographs unless they form part of a composite figure (plate). Where necessary, insert a scale bar in the illustration (not below it), as opposed to giving a magnification factor in the caption.

Colour illustrations

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to "grey scale" (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white versions of all the colour illustrations. As only one figure caption may be used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1993) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1994, pp. 12-16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and all co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1994a, 1994b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. *For periodicals*

Dame, R., Libes, S., 1993. Oyster reefs and nutrient retention in tidal creeks. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 171, 251-258.

b. *For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical*

Benzie, J.A.H., Ballment, E., Frusher, S., 1993. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes. In: Gall, G.A.E., Chen, H. (Eds.), *Genetics in Aquaculture IV. Proceedings of the Fourth International Symposium, 29 April-3 May 1991, Wuhan, China.* *Aquaculture* 111, 89-93.

c. *For books*

Gaugh, Jr., H.G., 1992. *Statistical Analysis of Regional Yield Trials.* Elsevier, Amsterdam, 278 pp.

d. *For multi-author books*

Shigueno, K., 1992. Shrimp culture industry in Japan. In: Fast, A.W., Lester, L.J. (Eds.), *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices.* Elsevier, Amsterdam, pp. 641-652.

6. Titles of periodicals mentioned in the list of references should be abbreviated following ISO 4 standard. The ISSN word abbreviations, for example, can be found at <http://www.issn.org/1stwa.html>.

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Papers accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

Use of the Digital Object Identifier

The digital object identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly "Articles in press" because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*): doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071. When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change. However, please check the DOI very carefully as an error in a letter or number will result in a dead link.

GenBank/DNA sequence linking

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** Note that in the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.

2. All botica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

Supplementary data

Preparation of supplementary data. Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

After acceptance

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the

Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Online Publication

Your article will appear on Elsevier's online journal database ScienceDirect as an "Article in Press" within approximately 4-6 weeks of acceptance. Articles in Press for this journal can be viewed at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00448486>. An Article in Press may be cited prior to its publication by means of its unique digital object identifier (DOI) number, which does not change throughout the publication process.

Reprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Author's Discount

There is a 30% discount on all Elsevier book publications. An order form will be sent together with the proofs.

Author Services

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit <http://www.elsevier.com/authors>. You can track your accepted article by visiting <http://www.elsevier.com/trackarticle>. The Elsevier Web page also provides the facility to set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions, and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication.

Aquaculture has no page charges.