JULIANA GRELL FERNANDES SILVEIRA

**Avaliação da eliminação de resíduos de verde de malaquita em
pescados empregando LC-MS/MS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Jonas Augusto
Rizzato Paschoal

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 14 de junho de 2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2019

SILVEIRA, J.G.F.	Avaliação da eliminação de resíduos de verde de malaquita em pescados empregando LC-MS/MS		MESTRADO FCFRPUSP 2019
---------------------	--	--	------------------------------

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silveira, Juliana Grell Fernandes

Avaliação da eliminação de resíduos de verde de malaquita em pescados empregando LC-MS/MS. Ribeirão Preto, 2019. 83p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Paschoal, Jonas Augusto Rizzato.

1. Aquicultura. 2. Verde de Malaquita. 3. LC-MS/MS.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Grell Fernandes Silveira

Avaliação da eliminação de resíduos de verde de malaquita em pescados empregando LC-MS/MS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Jonas Augusto
Rizzato Paschoal

Aprovado em: 14 de junho de 2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Aos meus pais, Júlia e Lineu, por
toda paciência, carinho e suporte
oferecidos sempre.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre presente em minha vida, principalmente nos momentos difíceis, e por todas as graças alcançadas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal, pelas oportunidades indescritíveis, confiança e por todo o aprendizado.

Ao técnico Agnaldo Fernando Baldo da Silva pela inteira disposição e auxílio na realização dos experimentos, bem como pela amizade.

Às amigas que fiz nessa jornada, Marina, Ana Carolina e Sarah por toda ajuda, tanto no laboratório, quanto na vida pessoal, e companheirismo durante os anos de Mestrado.

Aos amigos de laboratório, Pedro, Carlos, João, Júnior e Jonas, pelas ideias e momentos de descontração.

Aos amigos, Leonardo, Mariana e Fabiana, que me acolheram de volta à minha cidade natal, me ajudando na readaptação, compartilhando momentos de angústia e felicidade.

Aos meus pais, Júlia e Lineu, por toda a paciência, apoio e por me inspirarem a ser uma pessoa melhor sempre.

Aos professores da USP-RP, pelas aulas, avaliações e colaborações.

Aos servidores da USP-RP, e, especialmente, aos funcionários da Pós-Graduação em Toxicologia da FCFRP.

À Prof.^a Dr.^a Fabiana Pilarski e alunos do Centro de Aquicultura da UNESP de Jaboticabal, pela disponibilidade e auxílio nos experimentos com os peixes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro através do Projeto 2012/18334-0.

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

RESUMO

SILVEIRA, J. G. F. **Avaliação da eliminação de resíduos de verde de malaquita em pescados empregando LC-MS/MS.** 2019. 85f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O verde de malaquita (VM), corante amplamente utilizado na indústria têxtil, foi introduzido na aquicultura como agente ectoparasiticida, fungicida e antisséptico. Administrado por meio de banhos terapêuticos, atualmente, o VM tem seu uso liberado apenas para peixes ornamentais. O seu emprego em animais da aquicultura foi banido por diversos órgãos regulatórios mundialmente devido às propriedades carcinogênica, mutagênica e teratogênica do próprio VM, bem como do seu metabólito, o verde de leucomalaquita (VLM). Porém, devido à sua eficiência no tratamento de diversas infecções de importância na aquicultura, baixo custo de obtenção e a carência de alternativas terapêuticas devidamente regulamentadas para a aquicultura, reconhece-se que os produtores continuam administrando o VM a peixes, visto que programas de controle de resíduos em alimentos do mundo todo continuam reportando a detecção de seus resíduos em alimentos da aquicultura. Diante desta problemática, a presente dissertação teve como objetivo avaliar o perfil de eliminação do VM e do VLM em tilápia e pacu, peixes de importância econômica no país e que, por apresentarem composições corpóreas com diferentes teores de lipídio, podem apresentar diferenças significativas no perfil de eliminação residual do VM e VLM. Para tanto, métodos analíticos foram desenvolvidos para quantificação do VM e VLM em filés (músculo com pele em proporções naturais) de tilápia e pacu, empregando o método QuEChERS de extração associada à técnica instrumental de LC-MS/MS. Para separação cromatográfica foi utilizada coluna C₁₈ e fase móvel composta por tampão acetato de amônio (10 mM; pH 4) e ACN sob eluição por gradiente. O MS operou no modo de reações selecionadas (SRM), com ionização por ESI em modo positivo. Para a quantificação dos analitos, foi utilizado o verde brilhante como padrão interno. Para validação dos métodos tomou-se como referência os parâmetros linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e de quantificação e seletividade, recomendados pelo guia VICH GL49, o qual é voltado para métodos analíticos destinados a estudos de depleção residual. Os estudos de depleção em tilápia e pacu foram realizados a partir da exposição dos animais durante 1 hora por banho terapêutico de imersão em água contendo 1,0 mg L⁻¹ de VM. A eliminação residual foi avaliada a partir de análises das amostras colhidas dos peixes abatidos nos tempos correspondentes a 1 dia, 3, 5, 11, 17, 21, 26 e 32 dias após a exposição ao VM. Observou-se que o VM foi rapidamente metabolizado a VLM, seu metabólito mais persistente. Concentrações significativamente mais altas dos resíduos marcadores foram encontradas em pacu (até 1991,4 ± 659,5 ng g⁻¹ para a soma de VM e VLM; *n* = 10), o que atribuímos ser devido ao teor mais alto de gordura no músculo deste peixe, quando comparado à tilápia (até 285,5 ± 89 ng g⁻¹ para a soma de VM e VLM; *n* = 10). Por extrapolação dos dados estatísticos obtidos, estimou-se o período mínimo necessário para eliminação dos resíduos marcadores a níveis inferiores ao Limite Mínimo de Performance Requerido (2 ng g⁻¹) em 44 dias para a tilápia e 342 dias para o pacu.

Palavras-chave: *aquicultura; verde de malaquita; LC-MS/MS.*

ABSTRACT

SILVEIRA, J. G. F. **Residual determination of malachite green in fish employing LC-MS/MS**. 2019. 85f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

The malachite green (VM), a dye widely used in the textile industry, has been introduced into aquaculture as an ectoparasiticide, fungicide and antiseptic agent. Currently, the use of VM is permitted only for ornamental fish, while its use in farmed animals has been banned by many regulatory agencies worldwide due to the carcinogenic, mutagenic and teratogenic properties of the VM and its metabolite, the leucomalachite green (VLM). However, due to its effectiveness to treat important infections in aquaculture animals, its low cost and the lack of regulated therapeutic alternatives for aquaculture, illegal use of VM in fish continues, since control programs worldwide are still reporting the detection of their residues in aquaculture products. Therefore, this study aims to show the evaluation of the VM and VLM elimination profile in tilapia and pacu, both fish of significant economic importance in Brazil, which present different lipid contents in their fillets. For this purpose, analytical methods were developed for VM and VLM quantification in fillets (muscle with skin in natural proportions) of tilapia and pacu, using the QuEChERS extraction procedure and LC-MS/MS for analysis of the extracts obtained. For chromatographic separation were employed a C18 column and mobile phase composed by ammonium acetate buffer (10 mM, pH 4) and ACN under a gradient elution. Analyses were performed on monitoring Selected Reactions Mode (SRM) in positive mode of ESI interface. VM and VLM were quantified with Brilliant Green as internal standard. For analytical method reliability, the parameters (linearity, precision, accuracy, limit of detection, limit of quantification and selectivity) recommended by the VICH GL49 Guidance were taken as reference. Tilapia and pacu were exposed during 1 hour in therapeutic immersion bath containing 1.0 mg L^{-1} of VM in water. Samples taken from fish slaughtered at 1, 3, 5, 11, 17, 21, 26 and 32 days after exposure to the VM were analysed. It was observed the VM was rapidly metabolized to VLM, its most persistent metabolite. Higher concentrations of marker residues were found in pacu (up to $1991.4 \pm 659.5 \text{ ng g}^{-1}$ for the sum of VM and VLM; $n = 10$) compared to tilapia (up to $285.5 \pm 89 \text{ ng g}^{-1}$ for the sum of VM and VLM; $n = 10$), which we attribute to the higher fat content in the muscle presented by pacu. The minimum period required for the elimination of marker residues at levels below the Minimum Required Performance Limit (2 ng g^{-1}) was estimated by extrapolation of the statistical data obtained. The estimated periods were 44 days for tilapia and 342 days for pacu.

Keywords: *aquaculture; malachite green; LC-MS/MS*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do verde de malaquita (A) e do verde de leucomalaquita (B).	5
Figura 2. Tanques utilizados para a realização do experimento com os pacus e tilápias.	30
Figura 3. Preparo do banho terapêutico de VM (1,0 mg L ⁻¹) no dia 0.	31
Figura 4. Peixes submetidos à eutanásia (esquerda) e procedimento para retirada dos files (direita)	32
Figura 5. Estrutura química e propriedades físico-químicas do verde de malaquita (A), do verde de leucomalaquita (B) e do verde brilhante (padrão interno) (C).	34
Figura 6. Cromatograma característico da amostra branco fortificada com VM e VLM na concentração de 50 ng g ⁻¹ e VB (padrão interno) na concentração fixa de 50 ng g ⁻¹ após procedimento de extração.	36
Figura 7. Fluxogramas dos processos de extração: A) estudo de Hashimoto et al. (2012) e B) método desenvolvido no presente trabalho.	38
Figura 8. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g ⁻¹) de VM em tilápia para a faixa de concentração 0,5 a 50 ng g ⁻¹	41
Figura 9. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g ⁻¹) de VLM em tilápia para a faixa de concentração 0,5 a 50 ng g ⁻¹	41
Figura 10. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g ⁻¹) de VM em tilápia para a faixa de concentração 50 a 1000 ng g ⁻¹	41
Figura 11. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g ⁻¹) de VLM em tilápia para a faixa de concentração 50 a 1000 ng g ⁻¹	41
Figura 12. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g ⁻¹) de VM em pacu para a faixa de concentração 0,5 a 50 ng g ⁻¹	42
Figura 13. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g ⁻¹) de VLM em pacu para a faixa de concentração 0,5 a 50 ng g ⁻¹	42
Figura 14. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g ⁻¹) de VM em pacu para a faixa de concentração 50 a 1000 ng g ⁻¹	42
Figura 15. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g ⁻¹) de VLM em pacu para a faixa de concentração 50 a 1000 ng g ⁻¹	42
Figura 16. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g ⁻¹) de VLM em pacu para a faixa de concentração 500 a 2500 ng g ⁻¹	42
Figura 17. Cromatogramas da matriz de pacu fortificada em 0,5 ng g ⁻¹ e do branco da matriz de pacu para a transição 329>313 (VM).	48
Figura 18. Cromatogramas da matriz de pacu fortificada em 0,5 ng g ⁻¹ e do branco da matriz de pacu para a transição 331>239 (VLM).	48
Figura 19. Cromatogramas da matriz de pacu fortificada em 50 ng g ⁻¹ e do branco da matriz de pacu para a transição 385>341 (VB).	48
Figura 20. Cromatogramas da matriz de tilápia fortificada em 0,5 ng g ⁻¹ e do branco da matriz de tilápia para a transição 329>313 (VM).	48
Figura 21. Cromatogramas da matriz de tilápia fortificada em 0,5 ng g ⁻¹ e do branco da matriz de tilápia para a transição 331>239 (VLM).	49

Figura 22. Cromatogramas da matriz de tilápia fortificada em 50 ng g ⁻¹ e do branco da matriz de tilápia para a transição 385>341 (VB).....	49
Figura 23 - Curva de depleção residual na tilápia considerando a soma dos resíduos marcadores VM e VLM.....	52
Figura 24 - Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual considerando a soma dos resíduos marcadores do VM. LMDR: Limite Mínimo de Desempenho Requerido ($L_{NLMDR} = 0,7$); (a): reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%.....	53
Figura 25. Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual considerando a soma dos resíduos marcadores do VM. LMDR: Limite Mínimo de Desempenho Requerido ($L_{NLMDR} = 0,7$); (a): reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%.....	54
Figura 26. Curva de depleção residual em pacu considerando a soma dos resíduos marcadores VM e VLM.....	56
Figura 27. Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual considerando a soma dos resíduos marcadores do VM. LMDR: Limite Mínimo de Desempenho Requerido ($L_{NLMDR} = 0,7$); (a): reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%.....	56
Figura 28. Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual considerando a soma dos resíduos marcadores do VM. LMDR: Limite Mínimo de Desempenho Requerido ($L_{NLMDR} = 0,7$); (a): reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%.....	57
Figura 29. Comparação entre as curvas de depleção residual considerando a soma dos resíduos marcadores VM e VLM em pacu e tilápia.....	60
Figura 30. Equilíbrio entre o VM (esquerda) e sua base incolor e lipofílica, o VM-carbinol (direita), em solução aquosa.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos analíticos desenvolvidos para análise de VM e VLM em matrizes provenientes da aquicultura (continua)	15
Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da água das caixas durante o ensaio com os peixes.	30
Tabela 3. Gradiente da fase móvel para análise em LC-MS/MS. A: tampão acetato de amônio (pH 4,0; 10 mM). B: ACN (vazão: 0,3 mL min ⁻¹).	35
Tabela 4. Condições do MS/MS para detecção dos analitos.	35
Tabela 5. Eficiência de extração para as diferentes faixas de concentração avaliadas em pacu e tilápia.....	39
Tabela 6. Linearidade (n = 3) e coeficiente de correlação (r) dos analitos VM e VLM nas diferentes faixas de concentração e matrizes.	43
Tabela 7. Precisão e exatidão do VM e VLM em tilápia para a Faixa 1 de concentrações (0,5 – 50 ng g ⁻¹).....	43
Tabela 8. Precisão e exatidão do VM e VLM em tilápia para a Faixa 2 de concentrações (50 - 1000 ng g ⁻¹).....	44
Tabela 9. Precisão e exatidão do VM e VLM em pacu para a Faixa 1 de concentrações (0,5 – 50 ng g ⁻¹).	44
Tabela 10. Precisão e exatidão do VM e VLM em pacu para a Faixa 2 de concentrações (50 - 1000 ng g ⁻¹).....	45
Tabela 11. Precisão e exatidão do VLM em pacu para a Faixa 3 de concentrações (500 - 2500 ng g ⁻¹).	45
Tabela 12. Intervalo aceitável de exatidão e precisão para diferentes concentrações, segundo o guia VICH GL49 (FDA, 2015).	46
Tabela 13. Precisão e Exatidão para o LOQ em tilápia.	46
Tabela 14. Precisão e Exatidão para o LOQ em pacu.	47
Tabela 15 - Resultados analíticos das amostras de filé (carne + pele) de tilápia.	51
Tabela 16. Resultados analíticos das amostras de filé (carne + pele) de pacu.	55
Tabela 17. Estudos da literatura sobre a eliminação do VM e VLM em peixes.	61
Tabela 18. Resultados analíticos das amostras de filé (carne + pele) de tilápia (continua).....	77
Tabela 19. Resultados analíticos das amostras de filé (carne + pele) de pacu (continua).	81

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Limite de detecção (LOD)	277
Equação 2. Limite de quantificação (LOQ)	277

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CA	Centro de Aquicultura
C18	Octadecilsilano
CC α	Limite de Decisão
CC β	Capacidade de Detecção
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CV	Coeficiente de Variação
CVM	<i>Center for Veterinary Medicine</i>
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Comunidade Europeia
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ESI	Fonte de ionização do tipo <i>Electrospray</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FDA	Agência dos Estados Unidos que trata de Alimentos e a Administração de Fármacos (<i>Food and Drug Administration</i>)
H ₂ O	Água
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IDA	Ingestão Diária Aceitável
JECFA	Comitê de Peritos da FAO/OMS em Aditivos para Alimentos (<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>)
LC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série
LMDR	Limite Mínimo de Desempenho Requerido
LMR	Limite Máximo de Resíduo
LOD	Limite de Detecção (<i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de Quantificação (<i>Limit of Quantitation</i>)
<i>m/z</i>	Razão Massa/Carga
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeOH	Metanol
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio Anidro
MIP	Polímeros Molecularmente Impressos (<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>)
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sódio Anidro
NaAc	Acetato de Sódio Anidro
NH ₄ CH ₃ CO ₂	Acetato de Amônio Anidro
NH ₄ HCO ₃	Formiato de Amônio Anidro
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)
PbO ₂	Dióxido de Chumbo
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal
PSA	Amina Primária Secundária
p-TSA	Ácido p-tolueno sulfônico
Q-trap	Analisador de massa híbrido com um quadrupolo e um <i>ion trap</i> linear
QqQ	Analisador de massas do tipo Triplo quadrupolo
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
r	Coeficiente de Correlação Linear
RASFF	<i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>
SPE	Extração em Fase Sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SRM	Modo de Monitoramento de Reações Seleccionadas (<i>Selected Reaction Monitoring</i>)
TMPD	N, N, N', N'-Tetrametil-1,4-fenilenodiamina
TOF	Analisador de massas do tipo <i>Time-of-flight</i>
UE	União Europeia
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta/visível
VB	Verde Brilhante
VICH	<i>Veterinary International Conference on Harmonization</i>
VLM	Verde de Leucomalaquita
VM	Verde de Malaquita

Sumário

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE EQUAÇÕES.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Verde de malaquita.....	1
1.1.1 Emprego do verde de malaquita na aquicultura.....	1
1.1.2 Toxicologia do verde de malaquita.....	4
1.2 Aquicultura.....	7
1.2.1 Piscicultura.....	7
1.2.2 Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	8
1.2.3 Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	8
1.2.4 Uso irregular de substâncias na piscicultura.....	9
1.3 Métodos analíticos voltados para análise de resíduos do corante VM e seu leucometabólito em alimentos.....	12
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Materiais.....	21
3.1.1 Equipamentos e acessórios.....	21
3.2 Reagentes e solventes.....	21
3.2.1 Preparo de soluções.....	22
3.2.2 Amostras branco de filé de tilápia e pacu.....	23
3.3 Métodos.....	23
3.3.1 Método analítico empregando LC-MS/MS para determinação do VM e VLM.....	23
3.3.2 Extração do VM e do VLM do filé de peixe.....	24
3.3.3 Avaliação do método de extração do VM e do VLM do filé de peixe.....	25
3.3.4 Validação dos métodos analíticos para determinação do VM e VLM no filé de tilápia e pacu nas diferentes faixas de concentração.....	26
3.3.4.1 Linearidade.....	26
3.3.4.2 Precisão e Exatidão.....	27
3.3.4.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	27
3.3.4.4 Seletividade.....	28
3.3.5 Ensaio de depleção residual do VM e do VLM no filé de peixe.....	28

3.3.5.1	Condições experimentais.....	29
3.3.5.2	Tratamento dos animais	30
3.3.5.3	Coleta das amostras	31
3.3.5.4	Estudo de depleção	32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	34
4.1	Método analítico empregando LC-MS/MS para determinação do VM e VLM.....	34
4.2	Extração do VM e do VLM dos filés de tilápia e de pacu.....	36
4.3	Validação dos métodos analíticos para determinação do VM e do VLM no filé de tilápia e pacu nas diferentes faixas de concentração	39
4.3.1	<i>Linearidade</i>	40
4.3.2	<i>Precisão e Exatidão</i>	43
4.3.3	<i>Limite de Detecção e Limite de Quantificação</i>	46
4.3.4	<i>Seletividade</i>	47
4.4	Ensaio de depleção residual do VM e do VLM no filé de peixes	50
4.4.1	<i>Avaliação dos resultados da eliminação residual do verde de malaquita e seu leucometabólito em filés de tilápia</i>	50
4.4.2	<i>Avaliação dos resultados de eliminação residual do verde de malaquita e seu leucometabólito em filés de pacu</i>	54
4.4.3	<i>Comparação dos resultados de eliminação residual do verde de malaquita e seu leucometabólito em filés de tilápia e pacu</i>	58
5.	CONCLUSÕES	66
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
7.	ANEXO	76
8.	APÊNDICES	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 Verde de malaquita

1.1.1 Emprego do verde de malaquita na aquicultura

O verde de malaquita (VM) é um corante da classe dos trifenilmetanos, amplamente utilizado na indústria têxtil. Em 1933, o VM foi introduzido na aquicultura como agente ectoparasiticida, fungicida e antisséptico. Devido ao seu baixo custo, fácil acesso e reconhecida eficiência no tratamento e prevenção de diversas infecções em peixes, o VM continua sendo empregado na indústria aquícola ao redor do mundo (BUENO et al., 2010).

Estudos demonstraram que o VM possui atividade farmacológica contra parasitas, como o *Ichthyophthirius multifiliis*, *Ichthyobodo necator*, *Trichodina* sp., *Trichodinella* sp., *Chilodonella* sp, tendo sido frequentemente empregado no tratamento de infecções causadas por esses organismos. Ainda, é utilizado no tratamento de infecções fúngicas, como aquelas causadas por *Saprolegnia* sp (SUDOVA et al., 2007). É importante destacar que os patógenos citados são de distribuição global (VARGAS et al., 2008; ABDEL-BAKI; AL-QURAIHY, 2014) e acometem espécies de peixes tradicionalmente produzidas pela piscicultura, inclusive o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e a tilápia (*Oreochromis niloticus*), peixes economicamente importantes para o Brasil e que foram utilizados como modelo neste trabalho (KUBITZA; KUBITZA, 2000; FRANCESCHINI, 2012; CORRÊA et al., 2013).

O VM é usualmente empregado em diversos estágios do desenvolvimento do peixe, como ovos, alevinos e também no peixe adulto (YONAR; YONAR, 2010). As formas de administração mais comumente empregadas são através de mergulhos (infecções tópicas) ou banhos de curta ou longa duração, podendo o tratamento ser do tipo monocomponente ou multicomponente, sendo este quando o corante é aplicado em combinação com outra substância (SUDOVA et al., 2007).

Para o tratamento de infecções tópicas por fungos, são recomendados mergulhos rápidos dos animais (10 a 30 segundos), com concentração de 66,7-100 mg L⁻¹ de VM na água. Os banhos de curta duração (1 – 1,5 hora) são prescritos na concentração de VM em torno de 6,7 mg L⁻¹. No controle de protozoários ectoparasitas como o *I. multifiliis*, banhos de longa duração são empregados na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de VM. O fluxo de água do tanque deve ser interrompido

e deve ser fornecida uma aeração adequada. Após 24 horas de exposição, o fluxo deve ser liberado durante 1 hora e outra dose do corante deve ser aplicada. Este procedimento deve ser realizado 6 vezes. As concentrações do mergulho ou dos banhos podem variar de acordo com a espécie de peixe a ser tratada (SUDOVA et al., 2007).

Em estudos sobre o efeito do VM em peixes ornamentais parasitados por *I. multifiliis*, patógeno de ocorrência mundial e muito importante na aquicultura de água doce, observou-se que o corante causa severas alterações na estrutura de seus trofozoítos. Os efeitos iniciais começam com depleção de energia, distúrbio na osmorregulação e destruição das mitocôndrias. Em baixas concentrações, age como inibidor da fosforilação oxidativa e em concentrações mais altas, bloqueia as reações redox da cadeia respiratória (SCHMAHL et al., 1992).

Embora o VM seja uma substância bastante eficaz no tratamento de diversos patógenos que acometem os peixes, este agente tem seu uso liberado apenas em aquários contendo peixes ornamentais. A fim de evitar a transferência de resíduos da substância através da cadeia alimentar, a administração do VM a animais da piscicultura, os quais são destinados ao consumo humano, é vedada por diversos órgãos regulatórios, como a agência *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (FDA) e pela União Europeia (UE). Esta decisão foi motivada pela constatação de que o VM e seus produtos de metabolismo possuem propriedades carcinogênica, mutagênica e teratogênica em muitos animais e linhagens celulares (CHEN et al., 2013).

Mesmo com seu uso banido para o tratamento de peixes destinados ao consumo, é reconhecido que o corante continua sendo aplicado pelos produtores, normalmente com a justificativa da falta de alternativas tão eficazes quanto ele. Em alguns casos, ele é tido como substância de única escolha para tratamento de infecções fúngicas e parasitárias (BERGWERFF; KUIPER; SCHERPENISSE, 2004). Como resultado da proibição do VM por agências reguladoras do mundo todo, houve um sigificante crescimento no número de infecções por *Saprolegnia* em animais da aquicultura, já que, inicialmente, este fungo era controlado com o uso do corante (ROBERTSON et al., 2009; LA BASTIDE; NAUMANN; HINTZ, 2018). Até hoje o VM é considerado como o parasiticida mais eficaz contra o *I. multifiliis* e por este motivo, é empregado como controle positivo em testes *in vitro* que visam a avaliação de novas substâncias contra este parasita (SONG et al., 2018).

Dados disponibilizados pelo *National Residues Control Plans* e pelo *Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)*, programas de controle de resíduos em alimentos da UE, indicaram a presença de resíduos de VM e seu metabólito, o verde de leucomalaquita (VLM), em mais de 680 amostras de peixes e crustáceos durante os anos de 2002 a 2014 (NEBBIA et al., 2017). Estas notificações disponibilizadas pelo RASFF referem-se em sua maioria às mercadorias para importação na UE e em sua minoria ao mercado interno da EU (EFSA, 2016). Outra evidência do contínuo uso do VM está no *Import Alert 16-124* do FDA. Quando uma exportadora de produtos aquícolas não atende aos requisitos necessários para o comércio nos Estados Unidos da América (EUA), o FDA a inclui no Alerta de Importação 16-124, específico para casos em que houve uso de substâncias proibidas ou não aprovadas, sendo que toda mercadoria proveniente desta empresa será detida sem análise do seu conteúdo e qualidade. Em 2018, fabricantes de Bangladesh e da China foram incluídos nesta lista devido à detecção de resíduos de VM e VLM em seus produtos (FDA, 2018).

Embora a maioria dos estudos relatados na literatura sobre o VM abordam a aplicação do corante no tratamento de animais da aquicultura, é importante ressaltar que o VM também é empregado como corante de seda, lã, juta, bem como nas indústrias de couro, algodão, papel e acrílico. Só a indústria têxtil consome dois terços dos corantes fabricados e, durante o seu processo de produção, de 10 a 15% dos corantes são descartados nos efluentes, poluindo o meio aquático (MAJEED et al., 2014). O descarte de VM em corpos d'água tem gerado muita preocupação devido à possibilidade de haver, igualmente, a transferência de seus resíduos aos animais aquáticos destinados ao consumo humano, bem como a exposição direta dos humanos a estes resíduos (VYAVAHARE et al., 2018). Ainda, no aspecto ambiental, estes efluentes, quando não tratados, podem representar uma grande ameaça ao ecossistema circundante (AFROZE; SEN, 2018), tanto pelas suas propriedades nocivas já mencionadas, como, também, pela capacidade de bloquear a passagem de luz solar através da água, devido à sua cor brilhante e intensa, mesmo em concentrações baixas, reduzindo, dessa forma, a diversidade aquática (PANG; ABDULLAH, 2013; BHATIA et al., 2017).

Considerando o potencial uso indevido de VM na aquicultura, bem como, a contaminação desses organismos a partir de efluentes contendo descartes da indústria têxtil, a fiscalização de alimentos provenientes da aquicultura é necessária

visando a garantia da segurança alimentar e proteção da saúde do consumidor (SINGH et al., 2011; BILANDŽIĆ et al., 2012). Além disso, estudos toxicológicos e farmacocinéticos são importantes para avaliação do impacto do emprego indevido de substâncias críticas, como o VM, em animais destinados ao consumo humano (CVM, 2011).

1.1.2 Toxicologia do verde de malaquita

O VM apresenta-se como um sólido verde escuro e cristalino, preparado a partir da condensação de duas moléculas de dietilanilina com uma molécula de benzaldeído, na presença de cloreto de zinco concentrado ou ácido sulfúrico (MAJEED et al., 2014).

Nos peixes, o VM é rapidamente absorvido pelas brânquias e pode persistir no rim por mais de um mês e durante semanas no fígado (MAJEED et al., 2014). Após absorvido, a maior parte do corante é rapidamente metabolizada à sua forma reduzida e sem cor, o verde de leucomalaquita (VLM), sendo este, o seu principal metabólito. Devido à sua natureza lipofílica, o VLM tende a se depositar no tecido gorduroso do animal (BILANDŽIĆ et al., 2012), bem como no músculo e na pele, em quantidades mensuráveis, durante meses (NEBBIA et al., 2017). Além disso, os peixes, por serem animais poiquilotérmicos, possuem um metabolismo mais lento, quando comparado ao dos animais endotérmicos, favorecendo a permanência mais prolongada de resíduos de substâncias químicas em seus organismos (BERGWERFF; KUIPER; SCHERPENISSE, 2004).

Sabe-se que a microbiota intestinal dos animais expostos é responsável pela redução do VM ao VLM e há evidências de que o sistema citocromo P450 monooxigenase destes microrganismos esteja envolvido na biotransformação do VM, já que fármacos inibidores deste sistema enzimático inibiram a redução de VM a VLM em estudos sobre o metabolismo da substância (CHA; DOERGE; CERNIGLIA, 2001). As estruturas químicas do VM e de seu principal produto de biotransformação (VLM) são apresentadas na Figura 1.

Figura 1. Estrutura química do verde de malaquita (A) e do verde de leucomalaquita (B).

Sendo um sal de imínio conjugado, o VM atua como um excelente receptor/doador de elétrons, gerando espécies reativas de oxigênio, levando a um estresse oxidativo (KOVACIC; SOMANATHAN, 2014). Dados apresentados na literatura evidenciaram que as mitocôndrias são os principais alvos celulares do VM, tanto em peixes, quanto em mamíferos (PIERRARD et al., 2012).

Foi relatado que após exposição ao VM, é possível ocorrer uma diminuição da síntese de adenosina trifosfato (ATP) em uma das últimas etapas da cadeia de transporte de elétrons. Estudo conduzido em mitocôndrias cardíacas bovinas demonstrou que corantes catiônicos, especialmente o VM, inibem a ATPase nesta subunidade celular. Os distúrbios relatados são induzidos por concentrações de VM menores que as tipicamente encontradas em tecidos de peixe expostos ao corante (PIERRARD et al., 2012).

O VM é conhecido por ser um toxicante que tem como alvo muitos órgãos. Este corante causa danos em células hepáticas, branquiais, renais, intestinais, séricas, musculares e nas gônadas dos peixes (MAJEED et al., 2014). Ratos tratados com VM desenvolveram adenoma ou carcinoma de células foliculares da glândula tireoide e mama e adenoma hepatocelular (CULP et al., 2006). Estudos apontaram que o metabólito VLM provoca um número maior e ainda mais grave de alterações que o VM. Análises realizadas em DNA e em extratos de fígado indicaram que os compostos provavelmente são metabolizados de forma similar às aminas aromáticas carcinogênicas (CULP et al., 1999).

O metabólito, VLM, apresentou capacidade de ligar-se covalentemente ao DNA, formando adutos de DNA no fígado, demonstrando, portanto, um potencial efeito carcinogênico (SUDOVA et al., 2007). Em 2004, o Comitê de Mutagenicidade

do Reino Unido concluiu que devido à indução de mutações no DNA de ratos verificada em diversos estudos, o VLM deveria ser considerado como um potente mutagênico *in vivo* (RENEWICK; LEBLANC; SETZER, 2010).

Considerando a possível transferência de resíduos de VM e VLM pela cadeia alimentar e os riscos que eles representam aos consumidores, o Comitê de Peritos em Aditivos para Alimentos (JECFA), constituído por peritos da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS), determinou como inapropriado o estabelecimento de uma concentração para Ingestão Diária Aceitável (IDA) e não aprova o uso de VM em animais para produção alimentícia. Consequentemente, o Comitê não recomenda um Limite Máximo de Resíduo (LMR) para o VM e seu metabólito em produtos da aquicultura (FAO/WHO, 2008), o qual se refere ao nível mais alto de resíduo de um produto veterinário regulamentado que é legalmente tolerado no alimento.

A utilização de VM como medicamento veterinário na piscicultura foi banida por diversos órgãos regulatórios, como o FDA e pela UE (CHEN et al., 2013; EFSA, 2016), visto que não há um LMR definido para substâncias proibidas. Para fins de fiscalização, a Comunidade Europeia (EC), por meio da Diretiva 2002/657/EC, definiu um Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR) de 2 ng g⁻¹ para a soma dos resíduos de VM e VLM em produtos da aquicultura, no qual os métodos analíticos empregados para este fim devem estar aptos a quantificar tais analitos (EC, 2004). Em 2008, através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC), o Brasil adotou o mesmo valor de LMDR citado para ações regulatórias em peixes e camarões provenientes da aquicultura (MAPA, 2009).

O FDA reconhece a necessidade de estudos de avaliação de risco de substâncias banidas (FDA, 2008) e considera o estudo de depleção, para estimativa do tempo necessário para a eliminação total dos resíduos de substâncias químicas proibidas do tecido de animais, uma de suas prioridades em pesquisa no segmento da aquicultura (FDA, 2017). Neste âmbito, o Centro para Medicina Veterinária (*Center for Veterinary Medicine* – CVM) do FDA, cuja missão visa a proteção da saúde humana e animal, classificou o VM como sendo uma substância de alta prioridade nos estudos de fármacos/drogas utilizadas na aquicultura (CVM, 2011).

1.2 Aquicultura

1.2.1 Piscicultura

A aquicultura é definida pela FAO como a criação de organismos aquáticos, como peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas, diferenciando-se da pesca ou captura, pelo fato de que na criação destas espécies, há algum tipo de intervenção visando o aumento da produção. Como exemplos de intervenção, podem ser destacados a alta densidade de animais no espaço de produção (sistema intensivo), a alimentação controlada, a proteção contra predadores e o monitoramento das condições ambientais (FAO, 1998). Esta prática vem se destacando devido ao seu expressivo crescimento nos últimos anos: em 2016, a aquicultura alcançou 46,8% da produção global de espécies aquícolas, enquanto que em 2000 sua participação era de 25,7%. Ainda, em comparação a outros setores de produção alimentícia, a aquicultura é a atividade que apresenta maior crescimento nos últimos anos (FAO, 2018).

A maior parte da aquicultura no Brasil é representada pela criação de peixes (69,9%), seguida pela criação de camarões (20,6%) (IBGE, 2015). O Brasil é visto pelo mercado mundial como um país com grande potencial para aumentar ainda mais sua produção e contribuir para o fornecimento de proteína proveniente de produtos aquícolas, já que este apresenta importantes condições favoráveis à atividade, como seus reservatórios de água doce com mais de 8 mil km³ e um litoral com 7,4 mil km de extensão (SIDONIO et al., 2012). Ainda, o território brasileiro abrange tanto zonas de climas tropicais, quanto de climas subtropicais, as quais favorecem a produção da aquicultura de uma variedade de espécies no país (BARONE et al., 2017).

Embora a aquicultura seja reconhecida como uma alternativa para o atendimento à grande demanda de alimentos esperada decorrente do aumento da população global, previsto para 8,6 bilhões em 2030 (UNITED NATIONS, 2015), sérios impactos ecológicos estão associados a esta atividade, tais como, o desequilíbrio de habitats naturais, com a introdução de espécies não nativas, a deterioração da qualidade da água, o acúmulo de nutrientes nos sedimentos, os surtos de doenças e, finalmente, o impacto de maior relevância para este trabalho, o uso de medicamentos veterinários e substâncias químicas, as quais podem se

acumular no ambiente, ou mesmo nos tecidos dos animais que serão posteriormente consumidos por humanos (DAVID; PINHO; GARCIA, 2018; LIMA et al., 2018).

1.2.2 Tilápia (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia, um dos objetos de estudo deste trabalho, é a espécie mais criada no Brasil, representando 51% do total da produção de peixes, tornando o país o 4º maior produtor global da espécie (PEIXE BR, 2018). É uma espécie exótica, a qual foi introduzida no país na década de 1950 (PINCINATO; ASCHE, 2016). O grande crescimento na produção de tilápia foi alcançado devido à intensificação dos sistemas de criação/produção e dos investimentos no setor. O governo federal brasileiro, por exemplo, tem fornecido incentivos para a construção de instalações aquícolas em reservatórios de usina hidrelétricas, as quais representam 5,5 milhões de hectares de águas em lagos e represas, com o intuito de aumentar a produção de alimentos e o desenvolvimento social (BUENO et al., 2015).

É uma espécie onívora e de rápido crescimento. A sua aceitação para diferentes tipos de ração e sua resistência à água de baixa qualidade facilita sua produção, o que explica sua produção em mais de 100 países (FAO, 2019). O seu ciclo de produção em sistemas intensivos demora de 5 – 6 meses, quando o peixe adquire um peso de mais de 400 g, o qual é considerado ótimo para o rendimento dos tecidos consumíveis (SANTOS et al., 2007).

Atualmente, linhagens geneticamente modificadas de tilápia vem sendo desenvolvidas na busca de animais com melhores performances, como é o caso do tipo GIFT – *Genetically Improved Farmed Tilapia*, linha mais popular no Brasil, e a GST – *Genomar Supreme Tilapia* (SANTOS et al., 2019). Ainda, devido ao maior rendimento de produções constituídas apenas com machos de tilápias, vem sendo desenvolvida uma técnica de manipulação genética para produção total de machos, o que extingue a necessidade de reversão sexual com hormônios masculinos (FAO, 2019).

1.2.3 Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

O pacu, outra espécie alvo de estudo neste trabalho, é uma espécie nativa da bacia do Rio Paraná-Paraguai e uma das principais espécies criadas no Brasil. É uma espécie considerada emergente na aquicultura global devido às suas

características favoráveis de criação, valor ecológico e de comercialização, sendo, atualmente, também produzido na China e nos EUA (FARIAS et al., 2018). É um peixe de rápido crescimento e seu peso pode chegar a 1,2 kg em seu primeiro ano de criação (PAULA et al., 2014).

O pacu é uma espécie majoritariamente herbívora, com alta aceitação para diferentes alimentos. É considerado um peixe com uma favorável capacidade de adaptação, o que torna sua produção facilitada em diferentes climas e ambientes de qualidades variadas (RIBEIRO et al., 2017).

Além de suas características intrínsecas favoráveis a comercialização, o pacu também é empregado na hibridização de espécies para produção de animais com características ainda superiores às de seus precursores. Como é o caso da produção de ‘tambacu’, peixe proveniente da hibridização do pacu com o tambaqui (*Colossoma macropomum*). O tambacu é uma espécie bastante popular no Brasil, pois apresenta a robustez e a alta taxa de crescimento do tambaqui e a resistência à altas temperaturas do pacu (HASHIMOTO et al., 2012).

1.2.4 Uso irregular de substâncias na piscicultura

O grande crescimento da aquicultura vem sendo acompanhado pela emergência de diversas doenças infecciosas. Justamente pelo fato de que esta atividade é executada em um ambiente aquático e com alta densidade de animais, este sistema fornece condições favoráveis para a disseminação de infecções, o que pode levar a graves perdas econômicas ao produtor (PÉREZ-SÁNCHEZ; MORA-SÁNCHEZ; BALCÁZAR, 2018).

Para manter a qualidade e segurança do alimento e evitar perdas econômicas, o emprego de medicamentos veterinários é extremamente necessário para a atividade. Entretanto, os aquicultores enfrentam uma grande dificuldade nesta questão devido à baixa disponibilidade no mercado mundial de produtos veterinários aprovados para uso na aquicultura. Sendo a aquicultura intensiva uma atividade de expressão relativamente nova, há poucos quimioterápicos desenvolvidos e regulamentados especificamente para uso nessas espécies que estejam disponíveis no mercado nacional e internacional (BOISON; TURNIPSEED, 2015).

O processo para aprovação de novos fármacos por órgãos reguladores é extremamente oneroso e demorado, sendo o investimento muito alto em

comparação ao retorno financeiro. O potencial de vendas para o mercado da aquicultura em termos globais é limitado e, por isso, há um certo desinteresse por parte das indústrias farmacêuticas na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos e registros para este setor. Ainda, os estudos tradicionalmente conduzidos para aprovação de novos fármacos devem ser adaptados quando se trata de substâncias destinadas ao ambiente aquático, o que também gera, portanto, obstáculos à regulamentação de fármacos para a atividade (GREENLEES, 1997; RODGERS; FURONES, 2009).

Enquanto o número de espécies de animais terrestres criados para produção alimentar é limitado, no ano de 2000, foram contabilizadas mais de 210 espécies de animais criados na aquicultura (RODGERS; FURONES, 2009). Considerando que a aprovação da utilização de um fármaco é específica para a espécie e para a doença contra as quais a indicação e a posologia foram definidas na regulamentação (BOWKER et al., 2010), o processo de aprovação de novos fármacos para uso na aquicultura se torna mais complexo, quando comparado aos destinados a animais terrestres (TRUSHENSKI et al., 2013). Para regulamentação de um novo fármaco, o FDA requer que pelo menos seis diferentes espécies de peixes sejam testadas. Enquanto isso, em bovinos, suínos e aves, o FDA exige que sejam feitos estudos em apenas uma raça (BOWKER; TRUSHENSKI, 2015).

Na aquicultura brasileira são regulamentados o florfenicol e a oxitretaciclina como antimicrobianos, além de uma vacina empregada contra infecções estreptocócicas. Como antiparasitários, há um produto a base de triclorfon e uma formulação homeopática. Também são aprovadas substâncias utilizadas na desinfecção de instalações e aditivos empregados na alimentação dos animais visando a conservação e o melhoramento nutricional de rações (HASHIMOTO et al., 2011; SINDAN, 2016).

Com poucas opções de tratamento, os produtores no Brasil e em todo o mundo recorrem ao uso inapropriado de produtos não aprovados e/ou devidamente regulamentados por órgãos responsáveis para a atividade aquícola, como por exemplo, fazendo uso de produtos farmacêuticos regulamentados para outras espécies animais, como aves e suínos. Além disso, os produtores também recorrem ao uso de substâncias consideradas proibidas e/ou emprego de produtos químicos de uso geral. Dessa forma, a atividade pode se tornar irregular em relação às boas

práticas veterinárias e representar risco à questão de segurança alimentar (FDA, 2011; PASCHOAL et al., 2011).

A consequência direta do uso indevido de medicamentos veterinários ou de outras substâncias em animais destinados ao consumo é a presença de resíduos destes compostos, mesmo em concentrações baixas, em tecidos dos animais tratados (OKOCHA; OLATOYE; ADEDEJI, 2018). Reconhece-se que o uso de medicamentos na aquicultura colabora para o aumento da resistência de microrganismos aos antimicrobianos de importância na clínica humana e sua transferência pela cadeia alimentar. Ademais, resíduos de certas substâncias nos alimentos podem ser nocivos à saúde dos consumidores, como é o caso do cloranfenicol e dos trifenilmetanos, classe de corantes a qual pertence o VM (TURNIPSEED et al., 2018).

Embora o uso do VM seja proibido em muitos países, como os EUA, China e UE, devido às suas propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e genotóxicas, alguns programas de monitoramento de membros da UE continuam detectando resíduos da substância em produtos da aquicultura (HAN; HUANG; MAHUNU, 2017). Acredita-se que o maior risco de contaminação da carne de peixe com resíduos de VM seja derivado de produtos aquáticos importados de países asiáticos, especialmente o Vietnã e a China, onde as fiscalizações são menos rigorosas (CULP et al., 2006; PIERRARD et al., 2012; SANTOS; RAMOS, 2018). Por esse motivo, são necessárias regulamentações e supervisão apropriadas para evitar o uso inadequado de substâncias que podem resultar em consequências negativas à saúde dos consumidores.

Os marcos regulatórios em relação ao uso de medicamentos veterinários na aquicultura são limitados e diferem muito entre os países (SANTOS; RAMOS, 2018). A UE estabeleceu o LMDR de 2 ng g^{-1} para a soma de VM e VLM em produtos da aquicultura, utilizado para direcionar as medidas de ação na fiscalização do comércio internacional dentro da UE, no qual, alimentos que apresentarem resíduos abaixo do nível estipulado, não serão rejeitados. Já o Canadá, adotou um limite ainda menor que a UE: produtos contendo resíduos acima de 1 ng g^{-1} de VM e VLM não são permitidos para venda. Os produtos com resíduos abaixo deste limite podem ser comercializados desde que uma investigação exclua o uso intencional de VM durante a produção dos animais (SINGH et al., 2011; BILANDŽIĆ et al., 2012). Em Hong Kong, o VM é proibido desde 2005 e há uma emenda legislativa que

considera uma ofensa a importação ou venda de qualquer alimento contendo VM. Os infratores podem ser processados e a condenação inclui uma multa de US\$ 50.000 e prisão por 6 meses (HONG KONG GOVERNMENT, 2016). No Brasil, a fiscalização do uso de substâncias químicas na aquicultura e em outros setores agropecuários é realizada através do PNCRC e, para o VM, adotou-se como referência o LMDR de 2 ng g⁻¹ para a soma de VM e VLM em peixes da aquicultura (MAPA, 2009).

1.3 Métodos analíticos voltados para análise de resíduos do corante VM e seu leucometabólito em alimentos

A estratégia mais comum adotada para análises de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos é o emprego de uma técnica de separação (cromatografia a gás ou líquida), com um detector simples (ultravioleta (UV), detector de arranjo de diodos (DAD), etc.) ou um espectrômetro de massas (ROCCA et al., 2017). Atualmente, a maioria das publicações emprega a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS), utilizando analisadores do tipo triplo quadrupolo (QqQ), pois esta técnica possibilita o monitoramento de reações selecionadas (SRM), fornecendo uma alta sensibilidade e seletividade na análise (MALIK; BLASCO; PICÓ, 2010). Com o advento de analisadores de massas de alta resolução, como o *Time-of-flight* (TOF) e o *Orbitrap*, ainda, tornou-se possível análises de substâncias desconhecidas, que podem ser realizadas ou não em conjunto com análises de substâncias-alvo (MASIÁ et al., 2016).

Inicialmente, os métodos analíticos empregados para a detecção de VM em tecidos de animais eram, principalmente, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromagrophy* – HPLC) acoplado à espectroscopia de ultravioleta/visível (UV/Vis), devido ao fato de que o VM apresenta importantes grupos cromóforos em sua molécula, com máximo de absorvidade em 618 nm (HAN; HUANG; MAHUNU, 2017). Porém, com o conhecimento de que o VM é menos persistente que o VLM, iniciou-se a análise de ambos os analitos, empregando a cromatografia líquida com diferentes métodos de detecção, como a combinação do detector UV/Vis (618 nm) para o VM e a detecção por fluorescência para o VLM, ou, ainda, a determinação da soma dos dois analitos na forma de VM após a conversão

de VLM a VM, utilizando pré-colunas de oxidação recheadas de dióxido de chumbo (PbO_2) (VALLE et al., 2005).

Atualmente, a principal técnica de escolha para análise confirmatória de VM e VLM em peixes e crustáceos é LC-MS/MS, devido a vantagens como a alta seletividade e a alta detectabilidade (BILANDŽIĆ et al., 2012; BUENO et al., 2010). O analisador de massas do tipo triplo-quadrupolo é o mais comumente empregado, acompanhado da fonte de ionização do tipo eletronebulização (*electrospray* - ESI), operada em modo positivo (ESI+). Através desta técnica, é possível o monitoramento de duas ou mais transições de íons precursores a íons produtos por analito, como m/z 329>313 e 329>208 para o VM e m/z 331>239 e 331>316 para o VLM (EFSA, 2016).

Mesmo com a alta seletividade analítica, a detecção de resíduos a níveis residuais (ng g^{-1}) ainda depende de um eficiente procedimento de extração dos analitos de interesse. Os métodos de preparo de amostras mais frequentemente reportados para extração de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos são: extração com solvente orgânico, extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction* – SPE) e a técnica conhecida como *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe* (QuEChERS) (ROCCA, 2017). Para a extração de resíduos de VM de tecidos de peixe, alguns métodos envolvem a utilização de solventes orgânicos (metanol ou acetonitrila) misturados com solução tampão. Para limpeza dessas amostras, têm se empregado uma combinação de uma etapa de partição líquido-líquido e um cartucho de SPE (ASCARI et al., 2012; TARBIN et al., 2008). A utilização de cartuchos recheados com polímeros molecularmente impressos (*Molecularly Imprinted Polymers* – MIP) também já foi relatada para separação de resíduos de VM da amostra (BUENO et al., 2010).

O método QuEChERS é baseado numa extração com solvente orgânico, seguido de uma etapa *salting-out* e uma limpeza com sorventes do extrato resultante. A técnica é considerada como o método oficial para determinação de resíduos de praguicidas em alimentos, tanto pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), quanto para o Comitê Europeu de Normalização (HASHIMOTO et al., 2012). Devido a possibilidade de extração de analitos de diferentes polaridades, tais como o VM e o VLM, um íon e um composto altamente lipofílico, respectivamente, o QuEChERS é considerado um método versátil e se torna adequado para extração destes analitos (LÓPEZ-GUTIÉRREZ et al., 2013).

Considerando que o VM é proibido para uso em animais criados para produção alimentícia, é importante ressaltar que os métodos empregados para investigação devem atingir o LMDR de 2 ng g^{-1} para a soma de VM e VLM, segundo recomendações da Comunidade Europeia (EC, 2004) e do MAPA (MAPA, 2009).

A fim de garantir resultados analíticos confiáveis, os métodos analíticos empregados devem seguir certos critérios para serem considerados validados, como por exemplo: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação e robustez. Tais critérios e recomendações podem ser encontrados em regulamentações e guias desenvolvidos por agências reguladoras oficiais, como a ANVISA, o FDA e a EC (PASCHOAL et al., 2008). Para validação de métodos analíticos voltados para estudos de depleção de resíduos de substâncias químicas em tecidos de alimentos, existe, ainda, um guia específico recomendado para este fim, elaborado pelo FDA, o VICH GL49 (FDA, 2015).

Na tabela abaixo, são apresentados os métodos analíticos desenvolvidos para análise do VM e de seu metabólito, o VLM, em matrizes provenientes de animais da aquicultura. Estes métodos são referentes aos trabalhos publicados nos últimos 8 anos sobre este assunto, os quais têm como base fundamental a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, com diferentes analisadores. Ainda, a tabela traz informações gerais sobre os métodos de extração empregados nestes estudos.

Tabela 1. Métodos analíticos desenvolvidos para análise de VM e VLM em matrizes provenientes da aquicultura (continua)

Autor	Matriz	Extração	Técnica	Coluna	Fase Móvel	Vazão (mL min ⁻¹)	Linearidade	LOD (µg kg ⁻¹)	LOQ (µg kg ⁻¹)
Hurtaud- Pessel et al., 2011	Músculo de trutas, camarão, salmão e outros	Solução de hidroxilamina	LC-MS/MS (triplo- quadrupolo) ESI+	Waters Symmetry C18 (100x2,1 mm, 3,5 µm)	Fase aquosa:	0,25	0 – 2,0 µg kg ⁻¹	VM:	VM:
		ACN MgSO ₄ Centrifugação Evaporação Dissolução Centrifugação Filtração			Tampão de NH ₄ HCO ₃ (0,05M, pH 4,5) Fase orgânica: ACN (gradiente)			0,25 VLM: 0,17 (CCα)	0,32 VLM: 0,22 (CCβ)
Hashimoto et al., 2012	Músculo de tilápia	QuEChERS modificado:	LC-MS/MS (triplo- quadrupolo) ESI+	Waters XTerra MS C18 (150x2,1 mm, 5 µm)	Fase aquosa:	0,2	0 – 4,0 µg kg ⁻¹	VM:	VM:
		ACN acidificada MgSO ₄ + NaAC Centrifugação MgSO ₄ + PSA Centrifugação Evaporação Dissolução Filtração			Tampão NH ₄ CH ₃ CO ₂ (10 mM; pH 4,0) – 30% Fase orgânica: ACN – 70% (isocrático)			0,38 VLM: 0,25 (CCα)	0,55 VLM: 0,39 (CCβ)

(continuação da Tabela 1)

Autor	Matriz	Extração	Técnica	Coluna	Fase Móvel	Vazão (mL min ⁻¹)	Linearidade	LOD (µg kg ⁻¹)	LOQ (µg kg ⁻¹)
Chen et al., 2013	Músculo de peixe-leite e de tilápia	Solução de TMPD + tampão McIlvaine:ACN (50:50) Centrifugação SPE Evaporação Dissolução Filtração	LC-MS/MS (triplo- quadrupolo) ESI+	Agilent Eclipse XDB- C8 (4,6x150, 5 µm)	Fase aquosa: NH ₄ CH ₃ CO ₂ (0,5 mM) Fase orgânica: ACN com ácido fórmico (0,1%) (gradiente)	Não informado	0,5 – 10 µg kg ⁻¹	VM: 0,29 VLM: 0,15 (CCα)	VM: 0,39 VLM: 0,22 (CCβ)
		ACN Solução de hidroxilamina Solução de p- TSA Solução de McIlvaine Centrifugação Evaporação Dissolução SPE Evaporação Dissolução			Fase aquosa: Ácido fórmico (0,1%) Fase orgânica: ACN (gradiente)			VM: 0,09 VLM: 0,12	VM: 0,30 VLM: 0,40

(continuação da Tabela 1)

Autor	Matriz	Extração	Técnica	Coluna	Fase Móvel	Vazão (mL min ⁻¹)	Linearidade	LOD (µg kg ⁻¹)	LOQ (µg kg ⁻¹)
López-Gutiérrez et al., 2013	Músculo de camarão, salmão e de trutas	QuEChERS modificado: H ₂ O Milli-Q + ACN acidificada Na ₂ SO ₄ + NaAc Centrifugação Filtração	UHPLC-MS/MS (triplo-quadrupolo) ESI+	Phenomenex Kinetex C18 (50x2,1 mm, 2,6 µm)	Fase aquosa: NH ₄ HCO ₃ (10 mM) Fase orgânica: MeOH (gradiente)	0,3	1 – 250 µg kg ⁻¹	VM: 0,05-0,2 VLM: 0,03	VM: 0,2-0,5 VLM: 0,1
Nebot et al., 2013	Músculo de pescada	CH ₂ Cl ₂ acidificado Centrifugação MeOH acidificado Evaporação Dissolução	LC-MS/MS (triplo-quadrupolo) ESI+	Phenomenex Synergi Polar-RP (50x2,0 mm, 4 µm)	Fase aquosa: H ₂ O Milli-Q acidificada Fase orgânica: MeOH acidificado (gradiente)	Não informado	0 – 10 µg kg ⁻¹	Não informado	VM: 0,5 VLM: 1,0

(continuação da Tabela 1)

Autor	Matriz	Extração	Técnica	Coluna	Fase Móvel	Vazão (mL min ⁻¹)	Linearidade	LOD (µg kg ⁻¹)	LOQ (µg kg ⁻¹)
Kaplan et al., 2014	Músculo e pele de truta arco-íris	ACN acidificada	LC-MS/MS (Q-trap) ESI+	Phenomenex Synergi MAX-RP C18 (50x2,1 mm, 3 µm)	Fase aquosa: Tampão NH ₄ CH ₃ CO ₂ (2 mM; pH 4,5)	0,3	0 – 2,0 µg kg ⁻¹	VM: 0,41–0,43	VM: 0,53–0,56
		Centrifugação			Fase orgânica: ACN com 2mM de tampão NH ₄ CH ₃ CO ₂ (pH 4,5) (gradiente)			VLM: 0,24–0,34	VLM: 0,31–0,44
		Evaporação							
		Dissolução						(CCα)	(CCβ)
Giaccone et al., 2018	Músculo de badejo, sargo, cavalinha e de salmão	QuEChERS modificado: Solução de hidroxilamina	UHPLC- MS/MS (quadrupolo- Orbitrap) ESI+	Thermo Scientific Hypersil Gold C18 (50x2,1 mm, 1,9 µm)	Fase aquosa: H ₂ O + 0,1% de ácido fórmico + 5% de ACN	0,4	0,1 – 2,0 µg kg ⁻¹	VM: 0,09	VM: 0,28
		Tampão ACN/citrato (90:10 v/v)			Fase orgânica: MeOH + 0,1% de ácido fórmico + 5% de ACN (gradiente)			VLM: 0,06	VLM: 0,21
		PSA							
		Centrifugação PSA Centrifugação							

(conclusão da Tabela 1)

Autor	Matriz	Extração	Técnica	Coluna	Fase Móvel	Vazão (mL min ⁻¹)	Linearidade	LOD (µg kg ⁻¹)	LOQ (µg kg ⁻¹)
Dubreil et al., 2019	Músculo de camarão e de truta arco-íris	ACN MgSO ₄ Centrifugação Filtração	LC-MS/MS (triplo- quadropolo) ESI+	Phenomenex Kinetex C18 (100x2,1 mm, 2,6 µm)	Fase aquosa: mistura de NH ₄ CH ₃ CO ₂ (10 mM) e ácido fórmico 0,1% Fase orgânica: ACN (gradiente)	0,4	0,1 – 0,4 µg kg ⁻¹	Não informado	VM: 0,04 (CCα) VLM: não analisado
Gammoh et al., 2019	Músculo de pangasius, tilápia e de pescada	H ₂ O deionizada Hidroxilamina ACN Centrifugação Filtração	LC-MS/MS (Q-trap) ESI+	Phenomenex Synergi MAX-RP C18 (50x2,1 mm, 4 µm)	Fase aquosa: NH ₄ CH ₃ CO ₂ (10 mM) + 0,1% ácido fórmico Fase orgânica: ACN/H ₂ O (90/10) + NH ₄ CH ₃ CO ₂ (10 mM) + 0,1% ácido fórmico (gradiente)	0,4	0,01 – 100 µg kg ⁻¹	VM: 0,003 VLM: 0,003	VM: 0,01 VLM: 0,009

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi o estudo da eliminação residual do verde de malaquita (VM) e seu principal metabólito, o verde de leucomalaquita (VLM), em filé (músculo e pele em proporções naturais) de tilápia e pacu e comparação da persistência dessas substâncias em ambas as espécies de peixes, as quais apresentam diferentes teores lipídicos em sua constituição.

Para tanto, as seguintes etapas foram realizadas:

- i) Definição das melhores condições de separação cromatográfica e monitoramento de VM e seu metabólito, o VLM, por LC-MS/MS;
- ii) Estabelecimento de um método de preparo e extração dos analitos de amostras de filé de peixes, baseado na técnica QuEChERS, para obtenção de um extrato compatível ao sistema de detecção e quantificação empregado;
- iii) Avaliação da confiabilidade analítica dos métodos estabelecidos para análises dos analitos no filé de pacu e tilápia;
- iv) Realização dos banhos de imersão terapêutica com VM ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$ por 1 hora) nos pacus e tilápias para o estudo de depleção residual;
- v) Análise das amostras provenientes do estudo de depleção residual empregando o método analítico desenvolvido;
- vi) Análise estatística dos resultados obtidos com o propósito de avaliar o perfil de eliminação do VM e VLM no filé dos peixes e comparação de tal persistência em pacu e tilápia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos e acessórios

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Kyoto, Japão), constituído por duas bombas modelo LC10AD, controlador modelo SLC10A, forno modelo CTO10AS e injetor automático modelo SIL20A. Este sistema foi acoplado a um espectrômetro de massas composto por analisador de massas do tipo triplo-quadrupolo (Quattro LC, Micromass, Manchester, UK) com uma interface de eletronebulização, operando no modo positivo (ESI+). A aquisição e processamento dos dados foram efetuados através do software Micromass MassLynx versão 4.1.

As temperaturas da fonte de ionização e do gás de dessolvatação empregadas foram mantidas em 100°C e 350°C, respectivamente. O gás nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e secagem sob vazões de 80 e 460 L h⁻¹, respectivamente. A voltagem do capilar foi definida como 1 kV. O gás argônio foi empregado na câmara de colisão sob pressão de $1,78 \times 10^{-3}$ mbar.

A balança analítica da marca Shimadzu AUW220D (Shimadzu, Kyoto, Japão) foi utilizada para pesagem dos padrões comerciais para preparo das soluções-padrão. Para pesagem do filé de peixe e dos sais utilizados no método de extração do tipo QuEChERS foi utilizada uma balança semi-analítica do modelo Marte AL 200C (Marte Científica, São Paulo, Brasil).

Para o processo inicial de preparo da amostra envolvendo homogeneização e trituração do filé de peixe (músculo e pele em proporções naturais) e nas diferentes etapas do método de extração, foram empregados um moinho analítico básico (IKA A11), um agitador de tubo tipo *vortex* modelo AP56 (Phoenix, São Paulo, Brasil), uma centrífuga refrigerada Himac CF5RX (Hitashi, Tóquio, Japão) e um banho de ultrassom Maxiclean modelo USC-1450 (Unique, São Paulo, Brasil).

3.2 Reagentes e solventes

Todos os solventes utilizados no preparo da fase móvel foram de grau cromatográfico. Foram utilizados acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) da marca J. T. Baker (Estado do México, México) e ácido acético glacial da marca Mallinckrodt

Chemicals, (Phillipsburg, Estados Unidos). Os sais utilizados foram o acetato de sódio anidro (NaAc) da marca Synth (Diadema, Brasil), o sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) da marca Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) e o acetato de amônio da marca Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). A amina primária-secundária (PSA) e o sorvente C18 foram o da marca Agilent Technologies (Estados Unidos). A água utilizada para preparo da fase móvel foi purificada pelo sistema Milli-Q 3 UV System (Millipore, Alemanha).

Os padrões comerciais das substâncias utilizados foram: sal oxalato de verde de malaquita – VM (>95% - Vetranal – Sigma-Aldrich), verde de leucomalaquita – VLM (98% - Sigma-Aldrich) e verde brilhante – VB (>90% - Sigma-Aldrich).

3.2.1 Preparo de soluções

A partir dos padrões comerciais, as soluções-estoques individuais para o VM, VLM e VB (padrão interno – PI), foram preparadas em balões volumétricos de 10 mL, na concentração 1 mg mL^{-1} em MeOH. As soluções-estoques foram armazenadas em frascos âmbar, mantidas em freezer à -20°C e foram utilizadas por um período de até 3 meses.

Para a quantificação dos analitos nas amostras provenientes do estudo de depleção nos animais, empregaram-se curvas analíticas desenvolvidas com fortificação da matriz (amostra branco). Para tanto, foram desenvolvidas duas curvas analíticas, sendo uma abrangendo a faixa de concentrações de 0,5 a 50 ng g^{-1} (0,5, 1, 5, 15, 30 e 50 ng g^{-1}) e outra para a faixa de concentrações de 50 a 1000 ng g^{-1} (50, 100, 250, 500, 750 e 1000 ng g^{-1}), sendo que para a segunda faixa de concentrações, as amostras foram diluídas 20 vezes em ACN antes de serem injetadas ao equipamento. Ainda, para as amostras provenientes do estudo com pacu, uma curva analítica adicional para uma terceira faixa de concentrações para o VLM de 500 a 2500 ng g^{-1} foi desenvolvida, sendo essas amostras também diluídas 20 vezes em ACN.

Assim, foram preparadas soluções intermediárias de cada analito, nas concentrações de $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, mediante diluição das soluções-estoques em ACN, sendo utilizadas por um período de até 1 semana. A partir das soluções intermediárias, as soluções de trabalho foram preparadas diariamente em ACN: tampão acetato de amônio (10 mM, pH 4,0) (70:30, v/v). Na fortificação da

matriz branco para obtenção de curvas analíticas de concentrações baixas, foram preparadas soluções de trabalho contendo ambos os analitos nas concentrações de 10, 20, 100, 300, 600 e 1000 ng mL⁻¹. Para obtenção das curvas analíticas de concentrações altas, soluções de trabalho foram preparadas nas concentrações de 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 µg mL⁻¹.

O padrão interno (VB) em todas as amostras e em todas as faixas de concentração foi empregado na concentração de 50 ng g⁻¹. Para tanto, solução de VB foi preparada na concentração de 1 µg mL⁻¹.

3.2.2 Amostras branco de filé de tilápia e pacu

As amostras branco de filé (músculo e pele em proporções naturais) de tilápia e de pacu empregadas no desenvolvimento do método analítico foram adquiridas no Mercado Municipal de Ribeirão Preto (Brasil). Os filés com pele foram triturados e homogeneizados com o auxílio de um moinho analítico, aliquotados e armazenados em freezer (20 °C) até o momento do experimento. Durante o desenvolvimento do método, as amostras branco sempre foram analisadas sem a adição de padrões dos analitos e do PI para verificar possível presença desses compostos nas mesmas.

3.3 Métodos

3.3.1 Método analítico empregando LC-MS/MS para determinação do VM e VLM

Para a quantificação do VM e do VLM no filé de peixe (músculo e pele em proporções naturais), foi empregado o VB como padrão interno (PI). A fase estacionária empregada na separação cromatográfica foi a coluna analítica de fase reversa à base de sílica híbrida Xterra C18 MS (3,9 mm x 100 mm, 3,5 µm, Waters, EUA) e pré-coluna Xterra C18 MS (3,9 mm x 20 mm, 3,5 µm). A fase móvel foi composta por ACN e uma solução-tampão de acetato de amônio (pH 4,0, 10 mM), sob eluição por gradiente. A vazão da fase móvel foi de 0,3 mL min⁻¹. O forno da coluna cromatográfica foi programado para manter a corrida cromatográfica sob a temperatura de 28 °C.

Os analitos foram detectados no modo de Monitoramento de Reações Seleccionadas (SRM). Para a seleção das condições operacionais de monitoramento dos compostos de interesse através do espectrômetro de massas, soluções individuais de cada analito (VM, VLM e VB) foram preparadas na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, as quais foram individualmente injetadas por infusão direta ($20 \mu\text{L min}^{-1}$) no MS. Dessa forma, foram seleccionadas as transições de fragmentação iônica (m/z) para o monitoramento de cada analito, de acordo com os íons-produtos mais intensos. Neste procedimento, foram definidas as melhores voltagens do cone para cada analito e energias de colisão para as transições seleccionadas.

3.3.2 Extração do VM e do VLM do filé de peixe

O mesmo método de extração do VM e VLM do filé foi aplicado para o tecido da tilápia e do pacu. Para o desenvolvimento do método, filés de peixe com pele em proporções naturais ainda congelados foram triturados com o auxílio de um moinho analítico até se obter uma pasta homogênea do material. O filé homogeneizado foi aliquotado em porções de aproximadamente 10 g, as quais foram mantidas em freezer até o momento do processo de extração (tempo inferior a 1 mês). Para os experimentos de extração, as alíquotas foram descongeladas e 5 g de material foram colocados em tubos de polipropileno de 50 mL.

O procedimento de extração foi realizado a partir de 5 g de filé de peixe homogeneizado pelo moinho, aos quais foram adicionados 5 mL de ACN acidificada com 1% de ácido acético glacial como solução extratora, sendo essa mistura levada à agitação por *vortex* durante 1 minuto. Em seguida, adicionou-se 2 g de MgSO_4 anidro e 750 mg de NaAc anidro. Após a adição dos sais, a mistura foi levada à agitação em *vortex* durante 30 segundos. A amostra foi, então, mantida em um banho de ultrassom por um período de 12 minutos e em seguida foi centrifugada à 4°C e $2900 \times g$ por 10 minutos. Então, uma alíquota de 2 mL do sobrenadante foi transferida a um tubo contendo 50 mg do reagente PSA e 50 mg do sorvente C18 e levados à agitação por *vortex* durante 15 segundos. Mais 300 mg de MgSO_4 anidro foram adicionados à amostra e esta foi agitada por mais 20 segundos em *vortex*. A mistura foi, então, centrifugada novamente por mais 10 minutos à 4°C e $2900 \times g$. O sobrenadante foi filtrado com o auxílio de um filtro de membrana de celulose

regenerada, com porosidade de 0,20 μm de diâmetro, e transferido para um *vial* para análise em LC-MS/MS, onde 15 μL de amostra foram injetados.

3.3.3 Avaliação do método de extração do VM e do VLM do filé de peixe

Visando-se estimar a eficiência de extração como critério de avaliação do método em desenvolvimento, foi feita a comparação de resultados obtidos empregando-se a matriz branco de filé fortificado com os resultados obtidos a partir do extrato branco fortificado.

A matriz branco fortificada consistiu na adição dos analitos em concentrações conhecidas à matriz branco antes da execução do procedimento de extração. Visando permitir maior interação dos analitos com os componentes da matriz, depois da fortificação, as amostras foram deixadas em repouso por 15 minutos e ao abrigo da luz antes de se iniciar o procedimento de extração descrito. Após o processo de extração, as amostras foram analisadas no sistema LC-MS/MS.

O extrato branco fortificado consistiu na adição dos analitos em concentrações conhecidas no extrato obtido depois da execução do procedimento de extração da matriz branco e antes da realização das análises no sistema LC-MS/MS.

Esta avaliação foi realizada tanto para os pontos das curvas analíticas de concentrações baixas, quanto para os pontos das curvas analíticas de concentrações altas. As fortificações na matriz branco e no extrato foram realizadas de forma a se obter, para ambos os analitos, as concentrações equivalentes a 0,5, 1, 5, 15, 30 e 50 ng g^{-1} (Faixa 1) e 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 ng g^{-1} (Faixa 2). O mesmo foi realizado para a curva extra de VLM em pacu nas concentrações de 500, 1000, 1500, 2000 e 2500 ng g^{-1} (Faixa 3). Vale ressaltar, que as amostras de matriz fortificadas para as concentrações maiores que 50 ng g^{-1} foram diluídas 20 vezes em ACN antes de serem injetadas ao equipamento, bem como os seus extratos.

Assim, para a avaliação da eficiência de extração foi calculada a relação em porcentagem entre a área do pico obtida na matriz fortificada e a área do pico obtida no extrato fortificado para o mesmo nível de concentração para cada analito.

3.3.4 Validação dos métodos analíticos para determinação do VM e VLM no filé de tilápia e pacu nas diferentes faixas de concentração

Para os testes de validação, adotou-se como referência as recomendações do guia de validação do FDA voltado para métodos destinados a estudos de depleção residual de produtos veterinários em animais destinados ao consumo, o VICH GL49 (FDA, 2015). Com o objetivo de aprimorar a avaliação de alguns parâmetros, também foram tomadas como referência algumas considerações propostas no “Manual de Garantia da Qualidade Analítica para Resíduos e Contaminantes em Alimentos” do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011).

Os parâmetros avaliados para cada método foram: linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e seletividade.

3.3.4.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada separadamente para cada espécie de peixe e para cada faixa de concentração. Para a Faixa 1 de concentrações, as curvas analíticas foram obtidas fortificando-se 5 g da matriz branco (tilápia ou pacu) em seis níveis de concentração dos analitos em triplicata: 0,5, 1, 5, 15, 30 e 50 ng g⁻¹, incluindo o padrão interno (VB) mantido na concentração de 50 ng g⁻¹ em todos os níveis das curvas. Para a Faixa 2 de concentrações, fortificou-se 5 g da matriz branco (tilápia ou pacu), também em seis níveis de concentração dos analitos em triplicata: 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 ng g⁻¹, sendo que o VB foi adicionado em todos os níveis da curva de forma a se obter a concentração fixa de 50 ng g⁻¹. Adicionalmente, para a quantificação de VLM no pacu, ainda foi avaliada a linearidade numa Faixa 3 de concentrações, também em triplicata: 500, 1000, 1500, 2000 e 2500 ng g⁻¹.

Segundo o guia VICH GL49, a curva analítica deve contemplar ao menos 5 diferentes concentrações e a aceitabilidade de fatores de ponderação na regressão deve ser determinada pela avaliação dos erros residuais da curva analítica injetada em triplicata.

O manual do MAPA (2011) recomenda a avaliação da qualidade do ajuste e verificação da homoscedasticidade ou heterocedasticidade da resposta instrumental na regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), ou seja, regressão linear sem ponderação. Considerando essas recomendações, foram

realizadas análises da dispersão de resíduos, para avaliação da necessidade ou não de ponderação na regressão.

3.3.4.2 *Precisão e Exatidão*

A precisão do método foi avaliada através dos coeficientes de variação (CV,%) obtidos de repetições (n=3) das análises de amostras de matriz branco fortificadas em todos os níveis de concentração correspondentes às curvas analíticas dos analitos, sendo expressa de duas formas: (i) a precisão intradia, em que as repetições ocorreram num mesmo dia; e (ii) a precisão interdias, em que as repetições ocorreram em três dias diferentes. As análises foram sempre realizadas pelo mesmo analista, no mesmo equipamento e os resultados foram expressos como coeficiente de variação (CV,%).

A exatidão do método foi avaliada a partir dos mesmos testes realizados para a avaliação da precisão, porém, sendo expressa na forma de% de recuperação (intradia e interdias).

Como critérios de aceitação, tomou-se como referência aqueles preconizados pelo guia de validação do FDA (2015).

3.3.4.3 *Limite de Detecção e Limite de Quantificação*

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram obtidos a partir do método estabelecido, aplicado a seis amostras de matriz branco de filé de cada espécie. O LOD e o LOQ foram expressos como descrito nas equações 1 e 2:

$$LOD = 3 \times \frac{S_{branco}}{b} \quad \text{Equação 1}$$

$$LOQ = 10 \times \frac{S_{branco}}{b} \quad \text{Equação 2}$$

Onde, S_{branco} é o desvio-padrão da resposta de seis extratos brancos para o analito de interesse e b é o coeficiente angular da curva analítica obtida pelo

método dos mínimos quadrados ponderados, a partir da fortificação da matriz antes do processo de extração.

Segundo o guia VICH GL49 (FDA, 2015), o LOQ é considerado aceitável se atender os critérios de aceitação estabelecidos para a precisão e a exatidão. Dessa forma, amostras de matriz branco foram fortificadas em triplicatas nas concentrações do LOQ calculado para VM e VML, visando verificar a precisão e a exatidão obtida. Os valores de LOD e LOQ foram expressos em ng g^{-1} .

3.3.4.4 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando-se o cromatograma obtido a partir da amostra de matriz branco com o cromatograma obtido da amostra de matriz branco fortificada com os analitos (VM e VLM) e o padrão interno (VB), nos níveis de concentração equivalentes ao LOQ de cada analito. Esta avaliação foi realizada separadamente para o filé de tilápia e para o filé de pacu.

Segundo o Guia VICH GL49 (FDA, 2015), a resposta analítica da presença de eventual interferentes das amostras branco nos tempos de retenção dos analitos não deve ser maior que 20% da resposta obtida para as concentrações referentes aos respectivos LOQ. Para tanto, procedeu-se à quantificação das amostras branco nas transições de interesse.

O efeito matriz também foi considerado na avaliação da seletividade do método, ainda que o mesmo não tenha essa finalidade prevista no guia tomado como referência neste trabalho (FDA, 2015). Assim, os resultados de efeito matriz foram obtidos a partir da quantificação do extrato fortificado em todos os níveis de concentração das curvas analíticas de concentrações baixas e altas, através do emprego da equação da curva analítica dos analitos em solução e expressos em porcentagem do valor esperado.

3.3.5 Ensaio de depleção residual do VM e do VLM no filé de peixe

O protocolo usado neste experimento segue as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso

de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal – SP (Protocolo nº 009707/18) (ANEXO I).

3.3.5.1 Condições experimentais

Para os estudos de depleção residual, o total de 90 peixes da espécie *Piaractus mesopotamicus* (pacu) ($15,9 \pm 0,9$ cm, $72,6 \pm 10,9$ g) e 90 peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) ($17,7 \pm 0,9$ cm, $122,3 \pm 18,4$ g), obtidos da aquicultura Pompéia, São Paulo, Brasil, foram distribuídos em dois tanques de capacidade de 450 L cada (cada tanque contendo uma espécie de peixe), mantidos com aeração e fluxo de água contínuo, no Centro de Aquicultura (CA) da Unesp de Jaboticabal (Figura 2). O comprimento e o peso médio dos animais foram determinados por biometria logo antes da administração do verde de malaquita. Durante o período experimental foram monitorados os seguintes parâmetros: a temperatura da água, o pH, o oxigênio dissolvido, a condutividade, os sólidos totais e a salinidade. As medidas dos parâmetros avaliados encontram-se descritos na Tabela 2. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0.05$) entre os parâmetros da água monitorados em ambos os tanques. Os peixes foram alimentados com ração comercial (Nutripiscis, Brasil) indicada para peixes onívoros, três vezes ao dia (às 9 h, 13 h e 17 h), em quantidade equivalente a aproximadamente 2,5% do peso corpóreo médio dos animais.

Figura 2. Tanques utilizados para a realização do experimento com os pacus e tilápias.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da água das caixas durante o ensaio com os peixes.

Tanque	Parâmetros físico-químicos da água					
	Temperatura (°C)	pH	Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	Condutividade (mS cm ⁻¹)	Sólidos totais (g L ⁻¹)	Salinidade (%)
Tilápias	30,78 ± 0,09	6,74 ± 0,18	6,69 ± 0,52	0,178 ± 0,002	0,115 ± 0,001	0,01 ± 0,00
Pacus	30,44 ± 0,64	6,89 ± 0,22	6,90 ± 0,12	0,178 ± 0,004	0,115 ± 0,00	0,01 ± 0,00

3.3.5.2 Tratamento dos animais

Após 15 dias de ambientação, os peixes foram expostos durante 1 hora a banho terapêutico de imersão em água contendo VM na concentração de 1,0 mg L⁻¹ (Figura 3). Terminado o período de exposição, os peixes foram transferidos para outro tanque contendo água livre de VM por 10 minutos e, em seguida, transferidos de volta aos tanques iniciais, onde permaneceram até o fim do experimento.

Figura 3. Preparo do banho terapêutico de VM ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) no dia 0.

3.3.5.3 Coleta das amostras

Para cada período de amostragem (1, 3, 5, 11, 17, 21, 26 e 32 dias, correspondentes a 24, 72, 120, 264, 408, 504, 624 e 768 horas), 10 peixes de cada espécie foram coletados e abatidos. Destaca-se que o número de amostras e de períodos de amostragem superam o recomendado pelo Guia VICH GL57 (EMA, 2019), para avaliação do metabolismo e cinética de resíduos de produtos veterinários em espécies aquícolas, o qual indica o abate de 10 animais em, no mínimo, 4 períodos de amostragem.

Os animais foram submetidos à eutanásia por banho de imersão em benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$). Após a eutanásia, as escamas foram removidas e os filés (músculo e pele em proporções naturais) de cada peixe foram amostrados de ambos os lados do animal e armazenados a -20°C até o momento do processamento e análise por LC-MS/MS (período de até 1 mês). A Figura 4 ilustra os peixes submetidos à eutanásia com benzocaína e o procedimento para retirada dos filés.

Figura 4. Peixes submetidos à eutanásia (esquerda) e procedimento para retirada dos files (direita)

3.3.5.4 *Estudo de depleção*

A fim de realizar o tratamento dos dados obtidos pela análise das amostras coletadas por LC-MS/MS e se estimar o período necessário para eliminação do VM e do VLM a nível abaixo de $2 \mu\text{g g}^{-1}$ para a soma dos analitos, tomou-se como referência o Guia do FDA que trata sobre os princípios gerais para avaliação da segurança dos alimentos quando da administração de novas substâncias aos animais destinados à produção de alimentos (FDA, 2018).

O guia descreve um procedimento estatístico baseado em um limite de tolerância para estabelecer o período necessário em que a concentração do resíduo marcador atinja uma concentração de referência, no caso de substâncias regulamentadas para uso, o LMR. Reitera-se que no caso do VM, substância de uso proibido em animais de produção de alimentos, não há estabelecida uma concentração considerada segura para que o alimento possa ser consumido sem gerar um risco à saúde. Portanto, o procedimento recomendado pelo FDA foi adotado apenas para estimar o tempo em que a concentração do resíduo marcador do VM (soma do VM e VLM) atingiria níveis abaixo do LMDR ($2 \mu\text{g g}^{-1}$).

A análise estatística dos dados inicia-se assumindo que o perfil de eliminação de resíduos de uma substância no animal, após a interrupção do tratamento, segue uma cinética exponencial. Portanto, os dados de concentração obtidos pelas análises de cada amostra são transformados em logaritmos naturais, os quais são relacionados com os respectivos períodos de abate e, dessa forma, é criada uma regressão linear pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários. Ainda, a fim de se obter dados seguros, o FDA emprega um limite de tolerância de 99%, no qual

representa o percentil de amostras analisadas que estejam abaixo da concentração de referência, considerando um intervalo de confiança de 95%.

O período de eliminação do resíduo marcador é determinado quando a reta do limite de tolerância atinge ou se encontra abaixo da concentração de referência, no caso do presente estudo com o VM, o LMDR. A Agência Europeia de Medicamentos adota uma abordagem similar à do FDA para determinação do período de eliminação de resíduos de substâncias em tecidos de animais, porém o órgão emprega um limite de tolerância de 95%, considerando um intervalo de confiança de 95% (EMA, 2018). Os dois tratamentos estatísticos foram considerados no presente trabalho para comparação dos resultados obtidos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Método analítico empregando LC-MS/MS para determinação do VM e VLM

O VB foi escolhido como padrão interno deste método analítico devido à similaridade da sua estrutura molecular com a do VM e VLM (Figura 5).

Figura 5. Estrutura química e propriedades físico-químicas do verde de malaquita (A), do verde de leucomalaquita (B) e do verde brilhante (padrão interno) (C).

Para o estabelecimento das condições cromatográficas para o sistema LC-MS/MS utilizado, a escolha da fase móvel levou em consideração o fato de que o emprego de tampão acetato com pH ácido favorece a manutenção do VM e VB em suas formas iônicas (MEINERTZ et al., 1995; HASHIMOTO et al., 2011), não sendo transformados em suas bases carbinol, pela possível doação de hidroxilas presentes na fase aquosa.

Para a definição das condições de eluição da fase móvel, inicialmente foi testada uma eluição isocrática com ACN e tampão acetato de amônio (pH 4,0; 10 mM) (70 + 30, v/v), a qual se mostrou inviável devido ao tempo prolongado para eluição de todos os picos de interesse. Devido a maior afinidade do VLM pela fase estacionária, por ser o composto mais apolar (maior Log P), foi necessário estabelecer uma eluição por gradiente, aumentando a força da fase móvel com o tempo, para que a eluição do VLM ocorresse mais rapidamente.

A Tabela 3 mostra as condições de eluição da fase móvel por gradiente selecionadas para separação dos picos dos analitos de interesse, sendo a fase A o tampão acetato de amônio (pH 4,0; 10 mM) e a fase B, ACN.

Tabela 3. Gradiente da fase móvel para análise em LC-MS/MS. A: tampão acetato de amônio (pH 4,0; 10 mM). B: ACN (vazão: 0,3 mL min⁻¹).

Tempo (minutos)	% A	% B
0	25	75
4	25	75
5	1	99
9	1	99
10	25	75
15	25	75

Para a definição das condições de monitoramento dos analitos através do sistema LC-MS/MS, procedeu-se a injeção direta de soluções individuais dos analitos, preparadas em ACN e tampão acetato de amônio (pH 4,0; 10 mM) (1:1, v/v), ambos na concentração de 5 µg mL⁻¹, no espectrômetro de massas. Selecionaram-se duas transições para cada analito no modo SRM e foram selecionadas as voltagens do cone e energias de colisão de forma que se obtivesse a maior detectabilidade para transição. A fim de se obter uma maior seletividade dos analitos, foram definidas janelas de monitoramento para cada um deles. As condições selecionadas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Condições do MS/MS para detecção dos analitos.

Analito	Transições SRM (<i>m/z</i>)	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão (eV)	Janela de Monitoramento (min)
VM	329 > 208	55	35	3,8 - 5,4
	329 > 313*	55	35	
VLM	331 > 239*	35	30	10,25 – 11,6
	331 > 316	35	21	
VB	385 > 297	60	52	5,5 – 7,75
	385 > 341*	60	40	

*transições de íons empregadas na quantificação dos analitos.

Na Figura 6, é apresentado um cromatograma característico do monitoramento das substâncias em estudo, a partir de uma amostra branco de filé fortificado com os analitos na concentração de 50 ng g⁻¹.

Figura 6. Cromatograma característico da amostra branco fortificada com VM e VLM na concentração de 50 ng g⁻¹ e VB (padrão interno) na concentração fixa de 50 ng g⁻¹ após procedimento de extração.

4.2 Extração do VM e do VLM dos filés de tilápia e de pacu

Para o desenvolvimento do método de extração do presente trabalho, foi inicialmente tomado como referência o método desenvolvido por Hashimoto et al. (2012). Tal método é baseado na técnica QuEChERS, a qual foi inicialmente proposta em 2003 (ANASTASSIADES et al., 2003) para análise multirresíduo de agrotóxicos em alimentos. Em linhas gerais, a técnica é composta por três etapas principais: (1) extração com ACN; (2) partição pela adição de sais, como MgSO₄ ou NaCl e (3) limpeza do extrato pela técnica de *Extração em Fase Sólida Dispersiva*.

Ao longo do tempo, o QuEChERS original sofreu algumas modificações para aprimoramento da estabilidade e recuperação dos analitos. Uma das propostas foi a acidificação da ACN e adição do sal NaAc para alcançar um efeito tamponante (pH 4,0 – 5,0) e aumentar a recuperação de analitos dependentes de pH. Tal método

ficou conhecido como QuEChERS “acetato” (ZANELLA et al., 2015), o qual foi empregado no presente trabalho, assim como no trabalho de Hashimoto et al (2012).

O tamponamento provocado pela acidificação de ACN com 1% de ácido acético e adição do sal NaAc é importante para uma maior eficiência de extração e estabilidade dos analitos, principalmente para o VM, molécula básica, que em pH menor que seu pK_a (6,9) continua carregado positivamente, sem se converter para a sua forma não iônica e sem cor, a forma carbinol (SRIVASTAVA; SINHA; ROY, 2004). Ainda, a ACN acidificada promove uma maior precipitação de proteínas da matriz, favorecendo a eliminação de interferentes.

A adição de sais como o NaAc e $MgSO_4$ promove o efeito “*salting out*”, importante para reduzir a quantidade de água no extrato, favorecendo a transferência dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica (ZANELLA et al., 2015). Na etapa de limpeza, emprega-se a extração em fase sólida dispersiva por amina primária/secundária (PSA), substância com elevado efeito quelante que retém ácidos graxos livres, açúcares e lipídios iônicos da matriz. Ainda nesta etapa de limpeza, a utilização de C18 favorece a remoção de lipídios e compostos apolares (GUO et al., 2018).

Algumas adaptações ao método de Hashimoto et al (2012) foram realizadas visando a simplificação do método de extração para a proposta a que se destina o atual estudo. Na Figura 7, encontram-se os fluxogramas das etapas do método de extração do tipo QuEChERS proposto por Hashimoto et al (2012) e as do método definido no presente estudo. No trabalho de Hashimoto et al (2012), a etapa final do processo consistiu em submeter todo o sobrenadante resultante da segunda centrifugação (~ 10 mL) à evaporação por rota-evaporador a 50 °C e posterior redissolução do resíduo em 1 mL de fase móvel. Em métodos voltados à quantificação de analitos em concentrações muito baixas, como é o caso dos analitos alvos neste trabalho, a etapa de secagem e concentração dos analitos é muito importante visando a contribuição para o aumento da detectabilidade analítica. No entanto, destacamos que mesmo abdicando dessa etapa, o método estabelecido no presente trabalho permitiu detectabilidade suficiente à nossa proposta, conforme será apontado mais adiante.

Figura 7. Fluxogramas dos processos de extração: A) estudo de Hashimoto et al. (2012) e B) método desenvolvido no presente trabalho.

Em testes iniciais, avaliou-se a utilização de ar comprimido para secagem do sobrenadante. Porém, foram observadas perdas significativas dos analitos, principalmente do VM. Além disso, o uso de corrente de ar visando promover a concentração dos analitos não é recomendado devido à possibilidade de contaminação, oxidação e introdução de umidade no sistema (MAPA, 2011). Nos testes sem secagem, as áreas obtidas para os analitos foram suficientemente altas, mostrando que não seria necessária a etapa de secagem, que além de ser uma fase crítica devido ao risco de degradação das substâncias, tornava o processo mais extenso.

Visando-se não utilizar a secagem no processo de extração, foi possível reduzir a quantidade de matriz utilizada no processo de 10 g para 5 g e a ACN acidificada de 10 mL para 5 mL, pois sem concentração dos analitos por secagem, a quantidade em ng g^{-1} no filé de peixe seria igual à quantidade em ng mL^{-1} no extrato final. Consequentemente, todos os outros reagentes utilizados na extração foram reduzidos, o que tornou o processo menos dispendioso.

Ainda durante o desenvolvimento do método de extração deste trabalho, avaliou-se o emprego da ACN não acidificada, porém, os resultados obtidos indicaram perda de 15% na eficiência do processo de extração do VM em relação à condição empregando a ACN acidificada.

Os testes para desenvolvimento e aprimoramento do método de extração foram realizados utilizando como matriz o filé de tilápia. Quando aplicado ao filé de pacu, observou-se que a adição do sorvente C18 na etapa de limpeza evitou a deposição de resíduos do extrato na fonte de ionização do espectrômetro de massas, constatada visualmente quando injetados extratos de pacu.

Nas condições analíticas estabelecidas para o método de extração neste trabalho (Figura 7B), as eficiências de extração obtidas nas diferentes faixas de concentração avaliadas e para as duas diferentes matrizes (pacu e tilápia) estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Eficiência de extração para as diferentes faixas de concentração avaliadas em pacu e tilápia.

Faixa de concentração	Eficiência de Extração (%) (n = 3)			
	Pacu		Tilápia	
	VM	VLM	VM	VLM
0,5 – 50 ng g^{-1}	39,2 ± 2,7	77,5 ± 4,5	50 ± 2,7	68,3 ± 4,1
50 – 1000 ng g^{-1}	45 ± 5,5	75,3 ± 7,6	39,8 ± 2,3	76,2 ± 7,5
500 – 2500 ng g^{-1}	-	83,4 ± 7,2	-	-

4.3 Validação dos métodos analíticos para determinação do VM e do VLM no filé de tilápia e pacu nas diferentes faixas de concentração

Após estabelecido o método de extração e das condições analíticas do sistema LC-MS/MS, procedeu-se a validação analítica dos métodos, visando a

avaliação da confiabilidade dos resultados obtidos pelos mesmos. A validação foi realizada a partir de cinco curvas analíticas distintas e separadamente: duas curvas analíticas de concentrações baixas VM e VLM (Faixa 1), sendo uma com a matriz branco de tilápia e outra para o pacu; duas curvas analíticas de concentrações intermediárias de VM e VLM (Faixa 2), sendo novamente, uma para cada espécie; e uma curva de VLM em pacu para concentrações mais altas (Faixa 3).

Para tanto, adotou-se como referência as recomendações do guia de validação do FDA voltado para métodos destinados a estudos de depleção residual de produtos veterinários em animais destinados ao consumo, o VICH GL49 (FDA, 2015). Com o objetivo de aprimorar a avaliação de alguns parâmetros, também foram tomadas como referência algumas considerações propostas no “Manual de Garantia da Qualidade Analítica para Resíduos e Contaminantes em Alimentos” do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011).

Os parâmetros avaliados para cada método foram linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e seletividade.

4.3.1 Linearidade

A linearidade nas diferentes faixas de concentração de VM e VLM para matriz de tilápia e de pacu foi avaliada a partir da injeção de amostras branco fortificadas em cada nível de concentração das curvas analíticas em triplicata. As faixas verificadas foram: 0,5, 1, 5, 15, 30 e 50 ng g⁻¹ de VM e VLM em matriz de tilápia e pacu, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 ng g⁻¹ de VM e VLM em matriz de tilápia e pacu e 500, 1000, 1500, 2000 e 2500 ng g⁻¹ de VLM em pacu.

Foi avaliada a distribuição de resíduos para cada curva analítica obtida a partir da regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) (regressão linear simples). Devido à distribuição não aleatória dos resíduos (erros), indicando uma tendência, ou seja, um comportamento heterocedástico, optou-se por empregar o Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP). Portanto, para ajuste das curvas pelo MMQP selecionou-se o fator de ponderação 1/x. Este fator é indicado quando o valor de variância dos erros residuais (desvio-padrão dos erros residuais elevado ao quadrado) é proporcional ao valor x (concentração) (GU et al., 2014), o que foi observado no presente trabalho.

Para avaliação da qualidade do ajuste e confirmação da heterocedasticidade da regressão pelo MMQP, obteve-se o gráfico de dispersão dos resíduos normalizados da regressão ponderada em função da concentração. A distribuição dos resíduos normalizados se mostrou aleatória, sem indicação de qualquer tendência significativa, (Figura 8 a 16) tanto para o VM, quanto para o VLM, em todas as faixas de concentração analisadas, tanto nos filés de pacu como nos de tilápia, comprovando que não há homogeneidade das variâncias (heterocedasticidade), e o MMQP, deve ser, de fato, aplicado.

Figura 8. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g^{-1}) de VM em tilápia para a faixa de concentração 0,5 a 50 ng g^{-1} .

Figura 9. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g^{-1}) de VLM em tilápia para a faixa de concentração 0,5 a 50 ng g^{-1} .

Figura 10. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g^{-1}) de VM em tilápia para a faixa de concentração 50 a 1000 ng g^{-1} .

Figura 11. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g^{-1}) de VLM em tilápia para a faixa de concentração 50 a 1000 ng g^{-1} .

Figura 12. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g^{-1}) de VM em pacu para a faixa de concentração 0,5 a 50 ng g^{-1} .

Figura 13. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g^{-1}) de VLM em pacu para a faixa de concentração 0,5 a 50 ng g^{-1} .

Figura 14. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g^{-1}) de VM em pacu para a faixa de concentração 50 a 1000 ng g^{-1} .

Figura 15. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g^{-1}) de VLM em pacu para a faixa de concentração 50 a 1000 ng g^{-1} .

Figura 16. Gráfico da dispersão de resíduos normalizados em relação à concentração (ng g^{-1}) de VLM em pacu para a faixa de concentração 500 a 2500 ng g^{-1} .

A regressão calculada pelo MMQP e o coeficiente de correlação (r) foram obtidos pelo *software Masslynx V4.1* para cada curva analítica ($n = 3$) obtida durante a validação. O r obtido para todas as curvas foi superior a 0,995 (Tabela 6).

Tabela 6. Linearidade ($n = 3$) e coeficiente de correlação (r) dos analitos VM e VLM nas diferentes faixas de concentração e matrizes.

Analito		VM		VLM	
Matriz	Faixa de Concentração (ng g ⁻¹)	Regressão com Ponderação (1/x)	r	Regressão com Ponderação (1/x)	r
Tilápia	0,5 - 50	1,7152x – 0,0273	0,9984	3,4232 + 0,9239	0,9951
	50 - 1000	0,4028x – 0,5470	0,9996	1,1843x + 11,8806	0,9972
Pacu	0,5 - 50	1,4005x – 0,0744	0,9955	5,3266 – 0,1335	0,9955
	50 - 1000	0,455x – 0,4777	0,9970	0,1940x + 0,8927	0,9955
	500 – 2500	-	-	1,5505x – 8,8006	0,9976

4.3.2 Precisão e Exatidão

Nas Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11 encontram-se os resultados de precisão e exatidão para cada nível para o VM e VLM para cada faixa de concentração em tilápia e pacu.

Tabela 7. Precisão e exatidão do VM e VLM em tilápia para a Faixa 1 de concentrações (0,5 – 50 ng g⁻¹).

Analito	Concentração (ng g ⁻¹)	Precisão		Exatidão	
		Intradia (CV,%) (n=3)	Interdia (CV,%) (n=3)	Intradia (%) (n=3)	Interdia (%) (n=3)
VM	0,5	9,7	16,4	114	99,3
	1	2,4	1,9	104,7	103,8
	5	3,6	4,0	101,5	105,1
	15	3,3	4,2	102,4	106,2
	30	2,0	1,9	100,4	101,3
	50	2,1	2,1	98,7	96,9
VLM	0,5	21,6	15,3	106,4	103,2
	1	9,2	6,7	99	100,7
	5	11,4	9,5	91,8	97,1
	15	8,5	6,1	101	102,1
	30	1,5	3,1	104,2	100,7
	50	0,9	0,9	98,3	99,1

Tabela 8. Precisão e exatidão do VM e VLM em tilápia para a Faixa 2 de concentrações (50 - 1000 ng g⁻¹).

Analito	Concentração (ng g ⁻¹)	Precisão		Exatidão	
		Intradia (CV,%) (n=3)	Interdia (CV,%) (n=3)	Intradia (%) (n=3)	Interdia (%) (n=3)
VM	50	1,4	1,5	100	97,2
	100	1,3	0,5	97,7	99,7
	250	1,2	1,4	101,1	103,1
	500	2,1	2,4	102,2	102,7
	750	1,3	1,9	101,4	100,1
	1000	1,3	2,2	97,7	98,1
VLM	50	2,1	6,8	106,3	99,3
	100	4,3	2,3	103,1	96,8
	250	6,0	10,6	90,6	102,7
	500	8,2	0,4	95,9	101,7
	750	1,7	3,6	102,2	103,1
	1000	4,7	1,3	102,1	96,5

Tabela 9. Precisão e exatidão do VM e VLM em pacu para a Faixa 1 de concentrações (0,5 – 50 ng g⁻¹).

Analito	Concentração (ng g ⁻¹)	Precisão		Exatidão	
		Intradia (CV,%) (n=3)	Interdia (CV,%) (n=3)	Intradia (%) (n=3)	Interdia (%) (n=3)
VM	0,5	3,5	4,5	108,7	104,3
	1	1,5	2,0	98,6	99,5
	5	2,8	6,3	96,3	99,9
	15	2,8	3,6	95,7	95,9
	30	4,3	3,4	98,0	98,1
	50	2,8	2,4	102,8	102,3
VLM	0,5	16,7	4,2	100,0	96,7
	1	4,0	6,6	99,4	92,5
	5	14,3	6,0	97,3	105,9
	15	7,1	9,3	106,2	108,7
	30	5,7	5,5	96,7	98,1
	50	2,8	2,5	100,4	98,1

Tabela 10. Precisão e exatidão do VM e VLM em pacu para a Faixa 2 de concentrações (50 - 1000 ng g⁻¹).

Analito	Concentração (ng g ⁻¹)	Precisão		Exatidão	
		Intradia (CV,%) (n=3)	Interdia (CV,%) (n=3)	Intradia (%) (n=3)	Interdia (%) (n=3)
VM	50	5,4	6,9	101,4	102,3
	100	2,7	4,2	98,2	97,7
	250	5,1	2,9	96,7	96,5
	500	2,5	2,4	98,2	97,9
	750	4,4	3,6	102	102,9
	1000	4	1,9	103,4	103,6
VLM	50	9	15,3	100,3	96,9
	100	7,3	15,2	98,3	101,7
	250	8,7	11,9	102,7	106,6
	500	2,1	15,7	102,1	98,5
	750	9,3	11,6	103,1	99,4
	1000	8,4	9,5	94,7	92,5

Tabela 11. Precisão e exatidão do VLM em pacu para a Faixa 3 de concentrações (500 - 2500 ng g⁻¹).

Analito	Concentração (ng g ⁻¹)	Precisão		Exatidão	
		Intradia (CV,%) (n=3)	Interdia (CV,%) (n=3)	Intradia (%) (n=3)	Interdia (%) (n=3)
VLM	500	0,9	6,3	94,8	98,7
	1000	2	11,5	102,1	99,6
	1500	1,9	5,7	107,2	102,9
	2000	1,5	2,3	101,3	100,9
	2500	0,9	2,8	95,8	98

Todos os resultados de exatidão e precisão estão de acordo com os critérios mínimos de aceitação recomendados pelo Guia VICH GL49 (FDA, 2015). Na Tabela 12, estão apresentados os intervalos aceitáveis para precisão e exatidão.

Tabela 12. Intervalo aceitável de exatidão e precisão para diferentes concentrações, segundo o guia VICH GL49 (FDA, 2015).

Concentração do Analito (ng g ⁻¹)	Intervalo Aceitável		
	Exatidão	Precisão	
		Intradia	Interdias
< 1	50 - 120%	30%	45%
≥ 1 < 10	60 - 120%	25%	32%
≥ 10 < 100	70 - 110%	15%	23%
≥ 100	80 - 110%	10%	16%

4.3.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os LODs, calculados pela Equação 1, para o VM e o VLM foram 0,14 e 0,15 ng g⁻¹, respectivamente, na matriz de tilápia. Os LOQs, calculados pela Equação 2, para o VM e o VLM foram 0,47 e 0,49 ng g⁻¹, respectivamente. Para confirmar se o LOQ estimado era válido, três amostras de matriz branco de tilápia foram fortificadas na concentração 0,5 ng g⁻¹ e procedeu-se ao processo de extração. Paralelamente, uma curva em matriz também foi injetada para quantificação das amostras fortificadas no LOQ.

Dessa forma, foi possível estabelecer os valores de precisão e exatidão no LOQ. Os resultados de precisão e exatidão encontram-se na Tabela 13, abaixo:

Tabela 13. Precisão e Exatidão para o LOQ em tilápia.

Analitos	Concentração (ng g ⁻¹)	Precisão (CV,%) (n=3)	Exatidão (%) (n=3)
VM	0,5	6,2	95,1
VLM	0,5	10,9	91,3

O mesmo procedimento foi realizado para a amostra de pacu, obtendo-se um LOD de aproximadamente 0,1 ng g⁻¹ e um LOQ de 0,3 ng g⁻¹ para ambos os analitos. Porém, para padronização com o método desenvolvido para a matriz de tilápia, adotou-se como menor nível da curva analítica para o pacu, o ponto de 0,5 ng g⁻¹, o qual também foi submetido a avaliação de precisão e exatidão, como descrito na Tabela 14.

Tabela 14. Precisão e Exatidão para o LOQ em pacu.

Analitos	Concentração (ng g ⁻¹)	Precisão (CV,%) (n=3)	Exatidão (%) (n=3)
VM	0,5	5,9	111,8
VLM	0,5	10,4	89,3

Considerando que os resultados de precisão e exatidão atendem aos critérios exigidos pelo Guia VICH GL49 (FDA, 2015), constatou-se que o LOQ do método analítico para análise dos filés de tilápia e de pacu é igual a 0,5 ng g⁻¹ para o VM e o VLM, podendo ser utilizado como o menor ponto da curva analítica para ambos os analitos.

O LOQ para ambos os analitos atende ao LMDR preconizado pela EC de 2 ng g⁻¹ para a soma de VM e VLM em produtos da aquicultura (EC, 2004). Sendo o LOQ quatro vezes menor que o LMDR, o método desenvolvido se mostrou satisfatoriamente apto para a quantificação dos analitos.

4.3.4 Seletividade

Com os cromatogramas obtidos da matriz branco e da matriz branco fortificada com VM e VLM no LOQ (0,5 ng g⁻¹) e com o VB na concentração fixa de 50 ng g⁻¹ foi possível avaliar a seletividade do método. Nas Figuras 17, 18 e 19, estão os cromatogramas referentes ao branco e à matriz fortificada para as transições de quantificação para cada analito em pacu. Enquanto nas Figuras 20, 21 e 22, o mesmo pode ser encontrado para matriz de tilápia. É possível observar que não há interferentes da matriz (amostra branco) que coeluem com os analitos, assim comprova-se a seletividade do método.

As respostas dos picos interferentes nos brancos de ambas as matrizes foram inferiores a 20% da resposta dos picos dos analitos no LOQ (0,5 ng g⁻¹), atendendo à recomendação do Guia VICH GL49.

Figura 17. Cromatogramas da matriz de pacu fortificada em 0,5 ng g⁻¹ e do branco da matriz de pacu para a transição 329>313 (VM).

Figura 18. Cromatogramas da matriz de pacu fortificada em 0,5 ng g⁻¹ e do branco da matriz de pacu para a transição 331>239 (VLM).

Figura 19. Cromatogramas da matriz de pacu fortificada em 50 ng g⁻¹ e do branco da matriz de pacu para a transição 385>341 (VB).

Figura 20. Cromatogramas da matriz de tilápia fortificada em 0,5 ng g⁻¹ e do branco da matriz de tilápia para a transição 329>313 (VM).

Figura 21. Cromatogramas da matriz de tilápia fortificada em 0,5 ng g⁻¹ e do branco da matriz de tilápia para a transição 331>239 (VLM).

Figura 22. Cromatogramas da matriz de tilápia fortificada em 50 ng g⁻¹ e do branco da matriz de tilápia para a transição 385>341 (VB).

Ainda pertinente à seletividade do método, na avaliação do efeito matriz para o filé de tilápia não se detectou influência significativa em todos os níveis de concentração avaliados para o VM. Já para o VLM, o efeito matriz mostrou incremento do sinal analítico em torno de $42,6 \pm 6,3\%$ em todos os níveis avaliados. No filé de pacu, o efeito matriz para o VM também não foi observado, enquanto que para o VLM, constatou-se um efeito matriz de $75,6 \pm 15,4\%$.

Há de se esclarecer que o efeito matriz, quando presente, pode ser negligenciado quando se utiliza curva analítica a partir de matriz branco fortificada com os analitos e o padrão interno com fins quantitativos (MAPA, 2011; TRUFELLI et al., 2011). A avaliação do efeito matriz é de reconhecida importância em casos em que o método analítico não atenda aos critérios de avaliação dos parâmetros de validação, ou ainda, que não alcancem o LOQ almejado. Reitera-se que o método desenvolvido no presente estudo se mostrou adequado aos objetivos propostos.

4.4 Ensaio de depleção residual do VM e do VLM no filé de peixes

4.4.1 Avaliação dos resultados da eliminação residual do verde de malaquita e seu leucometabólito em filés de tilápia

Os resultados analíticos obtidos das amostras de filés de tilápia quanto às médias das concentrações ($n = 10$) de VM e seu principal metabólito, VLM, são apresentados na Tabela 15. A Tabela 18, presente na seção de Apêndices do presente trabalho, apresenta os resultados para cada amostra, em cada período de abate, integralmente.

Tabela 15 - Resultados analíticos das amostras de filé (carne + pele) de tilápia.

Abate das Tilápias		Peso (g)	Concentração do Resíduo Marcador (ng g ⁻¹)		
			VM	VLM	SOMA
24 horas após o tratamento	<i>Média (n=10)</i>	110,5	19,4	266,1	285,5
	<i>Mínimo</i>	91,3	5,0	171,6	176,6
	<i>Máximo</i>	134,8	43,8	388,2	432,1
	<i>Desvio</i>	15,9	12,6	76,9	89,0
	<i>CV (%)</i>	14,4	65,0	28,9	31,2
72 horas após o tratamento	<i>Média (n=10)</i>	116,0	1,7	101,7	103,4
	<i>Mínimo</i>	84,8	1,2	66,3	67,8
	<i>Máximo</i>	148,4	3,0	158,8	161,8
	<i>Desvio</i>	21,9	0,5	28,7	29,1
	<i>CV (%)</i>	18,8	30,2	28,2	28,1
120 horas após o tratamento	<i>Média (n=10)</i>	132,6	0,9	74,1	74,9
	<i>Mínimo</i>	100,1	0,6	37,9	38,6
	<i>Máximo</i>	167,7	1,1	136,8	138,0
	<i>Desvio</i>	20,3	0,1	33,9	34,0
	<i>CV (%)</i>	15,3	18,1	45,7	45,3
264 horas após o tratamento	<i>Média (n=10)</i>	134,3	< LOQ	30,0	30,0
	<i>Mínimo</i>	97,1	-	8,8	8,8
	<i>Máximo</i>	159,2	-	55,2	55,2
	<i>Desvio</i>	17,9	-	17,0	17,0
	<i>CV (%)</i>	13,3	-	56,6	56,6
408 horas após o tratamento	<i>Média (n=10)</i>	141,9	< LOQ	19,6	19,6
	<i>Mínimo</i>	121,0	-	4,6	4,6
	<i>Máximo</i>	163,5	-	34,9	34,9
	<i>Desvio</i>	15,6	-	10,5	10,5
	<i>CV (%)</i>	11,0	-	53,4	53,4
504 horas após o tratamento	<i>Média (n=10)</i>	132,9	< LOQ	7,6	7,6
	<i>Mínimo</i>	96,1	-	2,7	2,7
	<i>Máximo</i>	169,6	-	20,3	20,3
	<i>Desvio</i>	22,8	-	5,7	5,7
	<i>CV (%)</i>	17,1	-	74,9	74,9
624 horas após o tratamento	<i>Média (n=10)</i>	150,5	< LOQ	6,2	6,2
	<i>Mínimo</i>	107,1	-	2,1	2,1
	<i>Máximo</i>	207,5	-	11,4	11,4
	<i>Desvio</i>	31,2	-	2,9	2,9
	<i>CV (%)</i>	20,8	-	46,9	46,9
768 horas após o tratamento	<i>Média (n=10)</i>	163,0	< LOQ	1,7	1,7
	<i>Mínimo</i>	132,2	-	0,6	0,6
	<i>Máximo</i>	180,4	-	3,1	3,1
	<i>Desvio</i>	17,6	-	1,3	1,3
	<i>CV (%)</i>	10,8	-	72,3	72,3

Considerando que o resíduo marcador para o monitoramento de VM em peixes é constituído pela soma das concentrações de VM e de VLM, obtivemos a curva de depleção residual (modelo quadrático) apresentada na Figura 23.

Figura 23 - Curva de depleção residual na tilápia considerando a soma dos resíduos marcadores VM e VLM.

Conforme pode ser observado na Tabela 15 e na Figura 23, apenas algumas das amostras analisadas referentes ao último período de abate (768 horas ou 32 dias) apresentaram concentração para a soma dos resíduos inferiores ao LMDR (2 ng g⁻¹) neste estudo.

Visando-se obter uma estimativa quanto ao tempo mínimo necessário para que a concentração residual referente ao uso de VM atinja a concentração correspondente ao LMDR, promoveu-se a regressão linear da curva de depleção residual (Figura 24).

Figura 24 - Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual considerando a soma dos resíduos marcadores do VM. LMDR: Limite Mínimo de Desempenho Requerido ($\ln_{\text{LMDR}} = 0,7$); (a): reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%.

Em linhas gerais, as análises da regressão linear dos dados cinéticos descrevem a depleção do resíduo marcador (ou soma dos resíduos marcadores), muitas vezes, permitindo a estimativa do tempo necessário para que a concentração do resíduo atinja uma concentração de referência, como é o caso do Limite Máximo de Resíduos quando se trata de uma substância de uso aprovado. Reiterando que esse não é o caso do VM, o qual é proibido para uso em animais de produção de alimentos, no presente estudo, seguimos as recomendações do FDA para o tratamento dos dados apenas como forma de se estimar qual seria o tempo mínimo necessário para que a concentração dos resíduos do VM atinjam níveis de concentração abaixo do LMDR. Para tanto, consideramos a prerrogativa de segurança do FDA para que esse período de eliminação necessário considere um limite de tolerância, o qual fornece um intervalo no qual se localiza um percentil da população com um nível de confiança. Para tanto, o FDA recomenda empregar 99% de percentil e 95% de confiança para essa avaliação (reta c da Figura 24). Conforme mostra a Figura 24, ambas as retas relacionadas aos limites de tolerância (retas b e c) não cruzam a linha do eixo y do gráfico correspondente ao LMDR, de modo que se faz necessária uma extrapolação dos resultados para que se possa estimar o período mínimo de eliminação necessário a partir do experimento realizado, o que

infeere erros estatísticos inerentes à extrapolação. Porém, se assumíssemos esse risco (Figura 25), o período mínimo seria de 1045 horas, o que corresponderia a 43,5 dias, para o que se recomenda o arredondamento para cima (44 dias).

Figura 25. Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual considerando a soma dos resíduos marcadores do VM. LMDR: Limite Mínimo de Desempenho Requerido ($Ln_{LMDR} = 0,7$); (a): reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%.

Sumarizando, o período mínimo estimado para a eliminação de resíduos à níveis de concentração abaixo de 2 ng g^{-1} (LMDR) quando do uso de VM por banho de imersão ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$; 1 hora) em tilápia, criadas sob condições de temperatura média de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH 6,7 é de 44 dias. Porém, a realização de estudos complementares que considerem a extensão total do experimento por um período de pelo menos 2 meses ou mais seria importante.

4.4.2 Avaliação dos resultados de eliminação residual do verde de malaquita e seu leucometabólito em filés de pacu

Os resultados analíticos obtidos das amostras de filés de pacu quanto às médias das concentrações ($n = 10$) de VM e seu principal metabólito, VLM, são apresentados na Tabela 16. A Tabela 19, presente na seção de Apêndices do presente trabalho, apresenta os resultados para cada amostra, em cada período de abate, integralmente.

Tabela 16. Resultados analíticos das amostras de filé (carne + pele) de pacu.

Abate dos Pacus		Peso (g)	Concentração do Resíduo Marcador (ng g ⁻¹)		
			VM	VLM	SOMA
24 horas após o tratamento	<i>Média (n=10)</i>	74,2	229,8	1761,7	1991,4
	<i>Mínimo</i>	59,8	42,8	832,2	875,0
	<i>Máximo</i>	91,3	622,3	2661,4	3283,6
	<i>Desvio</i>	11,1	215,5	478,7	659,5
	<i>CV (%)</i>	14,9	93,8	27,2	33,1
72 horas após o tratamento	<i>Média (n=10)</i>	82,5	26,9	1195,7	1222,6
	<i>Mínimo</i>	63,2	10,6	617,8	628,4
	<i>Máximo</i>	109,0	59,5	1837,6	1869,5
	<i>Desvio</i>	13,6	13,9	392,9	399,8
	<i>CV (%)</i>	16,5	51,7	32,9	32,7
120 horas após o tratamento	<i>Média (n=10)</i>	78,0	24,1	1693,4	1717,5
	<i>Mínimo</i>	62,3	11,8	712,0	723,8
	<i>Máximo</i>	89,1	38,3	2274,9	2309,9
	<i>Desvio</i>	9,5	8,5	470,6	476,7
	<i>CV (%)</i>	12,2	35,4	27,8	27,8
264 horas após o tratamento	<i>Média (n=10)</i>	75,4	11,1	1072,0	1083,1
	<i>Mínimo</i>	58,8	7,4	671,0	683,2
	<i>Máximo</i>	92,6	14,9	1599,7	1614,6
	<i>Desvio</i>	10,7	2,0	258,1	258,7
	<i>CV (%)</i>	14,2	18,0	24,1	23,9
408 horas após o tratamento	<i>Média (n=10)</i>	86,9	3,4	1178,9	1182,3
	<i>Mínimo</i>	67,3	2,7	586,4	589,1
	<i>Máximo</i>	103,8	4,4	1536,7	1541,1
	<i>Desvio</i>	12,9	0,6	364,7	364,8
	<i>CV (%)</i>	14,9	17,5	30,9	30,9
504 horas após o tratamento	<i>Média (n=10)</i>	89,4	2,5	1251,5	1254,0
	<i>Mínimo</i>	58,8	1,4	821,7	823,9
	<i>Máximo</i>	114,5	3,8	2002,9	2006,8
	<i>Desvio</i>	16,2	0,8	335,0	335,4
	<i>CV (%)</i>	18,1	30,8	26,8	26,7
624 horas após o tratamento	<i>Média (n=10)</i>	92,7	1,9	567,8	569,7
	<i>Mínimo</i>	67,0	1,3	330,5	332,2
	<i>Máximo</i>	112,0	2,5	978,4	980,6
	<i>Desvio</i>	14,4	0,3	205,1	205,3
	<i>CV (%)</i>	15,5	17,3	36,1	36,0
768 horas após o tratamento	<i>Média (n=10)</i>	94,5	1,8	695,3	697,1
	<i>Mínimo</i>	74,2	1,1	416,9	417,8
	<i>Máximo</i>	121,9	2,9	982,1	985,0
	<i>Desvio</i>	14,2	0,6	158,8	159,3
	<i>CV (%)</i>	15,1	33,5	22,8	22,9

Considerando a soma das concentrações de VM e de VLM como resíduo marcador para o monitoramento da depleção residual, obtivemos a curva (modelo quadrático) apresentada na Figura 26.

Figura 26. Curva de depleção residual em pacu considerando a soma dos resíduos marcadores VM e VLM.

Conforme pode ser observado na Tabela 16 e na Figura 26, todas as amostras analisadas referentes ao último período de abate (768 horas, correspondendo a 32 dias) apresentaram concentrações de VM mais VLM superiores ao LMDR (2 ng g⁻¹) neste estudo.

Visando-se obter uma estimativa quanto ao tempo mínimo necessário para que a concentração residual referente ao uso de VM atinja a concentração correspondente ao LMDR, promoveu-se a regressão linear da curva de depleção residual (Figura 27).

Figura 27. Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual considerando a soma dos resíduos marcadores do VM. LMDR: Limite Mínimo de Desempenho Requerido ($Ln_{LMDR} = 0,7$); (a):

reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%.

Da mesma forma como feito com os dados do experimento com as tilápias, a estimativa do tempo necessário para que a concentração dos resíduos marcadores atinja o LMDR foi feita a partir da regressão linear dos dados cinéticos obtidos para o experimento com o pacu (reta *c* da Figura 27). Conforme mostra a Figura 27, assim como ocorreu no experimento com as tilápias (Figura 24), ambas as retas relacionadas aos limites de tolerância (retas *b* e *c*) não cruzam a linha do eixo *y* do gráfico correspondente ao LMDR, de modo que se faz necessária uma extrapolação dos resultados para que se possa estimar um período mínimo a partir dos estudos realizados, o que infere alguns erros estatísticos inerentes à extrapolação. Porém, se assumíssemos esse risco (Figura 28), o período mínimo seria de 8200 horas, o que corresponderia a 341,7 dias, para o que se recomenda o arredondamento para cima (342 dias).

Figura 28. Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual considerando a soma dos resíduos marcadores do VM. LMDR: Limite Mínimo de Desempenho Requerido ($\text{Ln}_{\text{LMDR}} = 0,7$); (a): reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%.

Portanto, o período mínimo estimado para a eliminação de resíduos à níveis de concentração de 2 ng g^{-1} (LMDR) quando do uso de VM por banho de imersão ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$; 1 hora) em pacu, nas condições de temperatura média de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH

6,9 é de 342 dias. No entanto, a realização de estudos complementares considerando a extensão total do experimento por um período de 1 ano ou mais seria importante.

4.4.3 Comparação dos resultados de eliminação residual do verde de malaquita e seu leucometabólito em filés de tilápia e pacu

Na literatura, foram relatados o impacto de alguns fatores sobre a cinética de eliminação do verde de malaquita (VM) e de seu leucometabólito (VLM) pelos peixes. Existem fatores ambientais, como a temperatura da água, a qual acelera a distribuição e a eliminação do VM e VLM em condições mais quentes (ALDERMAN; CLIFTON-HADLEY, 1993) e o pH, que com o seu aumento, favorece a transformação de VM na sua base lipofílica e sem cor, o carbinol, a qual acredita-se ser mais prontamente absorvida que seu cátion, colaborando para um acúmulo de maiores concentrações de resíduos de VM e derivados nos tecidos dos peixes (PLAKAS et al., 1996).

Fatores intrínsecos aos animais também devem ser considerados ao se tratar da cinética de eliminação do VM e do VLM. O estágio de desenvolvimento (maturidade) do animal quando exposto ao VM tem influência no período de permanência dos resíduos do corante nos tecidos. Em estudos nos quais ovos de peixes foram tratados com o corante, devido à alta taxa de crescimento nesta fase, em poucos dias, quase todo o resíduo de VM ou VLM foi eliminado de alevinos oriundos desses ovos (MEINERTZ et al., 1995; NISKA et al., 2009). Ainda, estudos indicaram que o tratamento com VM até o estágio juvenil dos peixes pode resultar em resíduos indetectáveis em tecidos para consumo destes peixes adultos, porém, a exposição em estágios posteriores a este pode resultar em resíduos detectáveis de VM e VLM nos peixes adultos devido à redução natural da taxa de crescimento nesta fase de desenvolvimento (BERGWERFF; KUIPER; SCHERPENISSE, 2004).

Outro fator intrínseco a ser considerado diz respeito ao conteúdo de lipídios nos tecidos dos peixes, o qual, aparentemente, também influencia na distribuição e cinética de eliminação do VM e seus metabólitos (PLAKAS; DOERGE; TURNIPSEED, 1999). Portanto, vale ressaltar que as espécies selecionadas para os estudos no presente trabalho, além de representarem significativa importância econômica ao país, apresentam diferentes teores de lipídios em seu músculo, o que

poderia revelar diferenças importantes na cinética de eliminação residual do VM e/ou do VLM entre essas espécies.

Tratando-se da eliminação do VM no presente estudo, a maior concentração encontrada em ambas as espécies ocorreu no primeiro período de abate, logo após o tratamento com esse corante (dia 1), porém pouco expressiva em relação à concentração de VLM. No período em questão, o teor de VM encontrado no filé de tilápia foi de 7,3% em relação ao VLM quantificado na mesma matriz e para o pacu, esta relação foi de 13%, indicando uma rápida metabolização do VM em VLM em ambas espécies estudadas. Tal observação corrobora o fato de que o VM, depois de absorvido pelas brânquias, é rapidamente biotransformado à VLM (PLAKAS et al., 1996) e prontamente distribuído ao fígado e rins (JIANG; XIE; LIANG, 2009).

A Figura 29 apresenta uma comparação do comportamento de depleção residual para a soma de VM e VLM entre as espécies estudadas, em que se denota a discrepância nas concentrações obtidas dos resíduos marcadores entre as espécies estudadas, bem como, na cinética de eliminação residual. Como pode ser observado, as concentrações de VLM encontradas nos pacus após exposição ao VM foram muito superiores àsquelas encontradas nas tilápias, com cinética de eliminação mais lenta, indicando que seus resíduos persistem por mais tempo no filé do peixe que contém um conteúdo lipídico mais alto. Essas observações estão de acordo com o que se esperava sobre a influência do conteúdo lipídico nos tecidos dos peixes, conforme observado por PLAKAS et al. (1996), onde os autores apontaram que a gordura atua como um importante depósito de VLM, o que prolonga a eliminação de seus resíduos. Ainda, em estudo sobre a distribuição do VM e VLM em diversos tecidos de peixes, pesquisadores concluíram que o conteúdo de lipídio nos tecidos é o fator mais importante na distribuição do VLM no organismo dos peixes (JIANG; XIE; LIANG, 2009). Vale destacar aqui, que os experimentos com ambas as espécies de peixes foram realizados de forma simultânea, visando-se evitar que alterações nas condições ambientais de cultivo pudessem influenciar de forma significativa nessa comparação.

Destacamos que o pacu é classificado como um peixe de alto teor de gordura (> 8% de lipídio) dentre as espécies criadas em sistemas de aquicultura (BICUDO; SADO; CYRINO, 2012), enquanto a tilápia apresenta em média um conteúdo de lipídio de aproximadamente 2,75% (JIM; GARAMUMHANGO; MUSARA, 2017),

sendo, portanto, classificada como um peixe magro, de baixo teor de gordura (JOBLING, 2002).

Figura 29. Comparação entre as curvas de depleção residual considerando a soma dos resíduos marcadores VM e VLM em pacu e tilápia.

Atualmente, são poucos os estudos descritos na literatura sobre a eliminação do VM e metabólitos por animais de interesse na aquicultura e até o presente momento, não encontramos qualquer trabalho publicado em que se avaliou a eliminação destes compostos em peixes de interesse da aquicultura brasileira, como a tilápia e o pacu.

A seguir, a Tabela 17 apresenta um sumário de informações importantes sobre alguns estudos encontrados na literatura envolvendo a exposição de peixes ao VM e, na sequência, destacamos os principais resultados obtidos desses estudos numa comparação com os encontrados nos presentes estudos.

Tabela 17. Estudos da literatura sobre a eliminação do VM e VLM em peixes.

Autores	Espécie de Peixe	Peso médio (g)	Condições da água		Tecido analisado	Banho de imersão com VM		Observações
			Temperatura (º C)	pH		Concentração (mg L ⁻¹)	Duração (min)	
1	Truta arco-íris	199	8	7,6	músculo	1,6	40	68100 ng g ⁻¹ de VM após 90-120 min da exposição (C max)
		241	16					10790 ng g ⁻¹ de VM após 90-120 min da exposição (C max)
2	Truta arco-íris	203,6	12 - 14	-	músculo	0,2	8640 (6 dias)	VLM persistiu por 10 meses após tratamento
3	Bagre-americano	500 - 700	21	7,1	músculo	0,8	60	750 ng g ⁻¹ de resíduos de VM no 14º dia após exposição
4	Brema-branca	320	20	7,1	músculo	6,0	20	0,01 (Brema-branca) – 0,03 ng g ⁻¹ (Peixe-dourado) de VM e 0,01 (Peixe-dourado) – 0,02 ng g ⁻¹ (<i>Snakehead fish</i>) de VLM no 10º dia após exposição
	Peixe-dourado	250						
	<i>Snakehead fish</i> (<i>Ophiocephalus argus</i>)	450						
5	Carpa-comum	275,6	11 - 15	7,1 - 7,8	músculo com pele	2,0	60	464 ng g ⁻¹ (VM+VLM) no 1º dia e 682 ng g ⁻¹ (VM+VLM) no 66º dia
						2,0	180	3519 ng g ⁻¹ (VM+VLM) no 1º dia e 646 ng g ⁻¹ (VM+VLM) no 37º dia
	Truta arco-íris	20,3	9 - 15	7,1 - 7,6		1,0	60	3251 ng g ⁻¹ (VM+VLM) no 1º dia e 4,6 ng g ⁻¹ (VLM) no 262º dia
						1,0	180	8034 ng g ⁻¹ (VM+VLM) no 1º dia e 2,1 ng g ⁻¹ (VLM) no 289º dia
						1,5	60	3348 ng g ⁻¹ (VM+VLM) no 1º dia e 6,6 ng g ⁻¹ (VLM) no 195º dia

Autores: ¹Alderman; Clifton-Hadley, 1993²Machova et al. 1996³Plakas et al. 1996⁴Jiang; Xie; Liang, 2009⁵Bajc; Jenčič; Gačnik, 2011

As observações destacadas sobre os resultados obtidos nos trabalhos sumarizados na Tabela 17, não podem ser prontamente comparadas com os resultados obtidos a partir dos estudos executados aqui, dadas as diferenças significativas de dose de tratamento e condições de exposição ao VM, além do fato de terem sido utilizadas amostras de músculo (sem pele) para as análises dos resíduos ao invés de filé (músculo e pele em proporções naturais). Desta forma, a seguir, tomamos principalmente como referência para discussão dos resultados obtidos, as observações obtidas por Bajc, Jenčič e Gačnik (2011), por esta se constituir na referência tomada como base do nosso projeto para selecionar as condições experimentais com as tilápias e os pacus. No entanto, algumas observações apresentadas nas demais referências destacadas na tabela também foram consideradas na discussão a seguir.

No trabalho de Bajc, Jenčič e Gačnik (2011), onde trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foram expostas a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de VM durante 1 hora, mesma concentração empregada na presente dissertação, a temperatura do tanque em que os peixes foram mantidos após o tratamento variou de 9 a 15°C e o pH de 7,1 a 7,6. A concentração média residual (VM + VLM) encontrada nos filés (músculo com pele) das trutas foi de 3251 ng g^{-1} no primeiro dia após o tratamento e de $464,7 \text{ ng g}^{-1}$ nas amostras referentes ao período de 33 dias após o tratamento. Essas concentrações foram significativamente maiores do que as observadas no presente trabalho nos mesmos períodos para a tilápia ($285,5 \text{ ng g}^{-1}$ no 1º dia e $1,7 \text{ ng g}^{-1}$ no 32º dia) e, ainda que estejam mais próximas aos resultados em filé de pacu ($1991,4 \text{ ng g}^{-1}$ no 1º dia e $697,1 \text{ ng g}^{-1}$ no 32º dia), a média das concentrações para a truta arco-íris foi ligeiramente acima, pelo menos nos primeiros 5 dias após o tratamento. São pelo menos 4 aspectos que podem ser considerados ao compararmos os resultados do presente trabalho com o de Bajc, Jenčič e Gačnik (2011), sendo eles: o conteúdo de lipídio no tecido muscular das espécies envolvidas, a temperatura da água, o estágio de desenvolvimento dos peixes e o pH da água.

Sobre o teor lipídico no filé de truta arco-íris, tem-se que em peixes Salmonídeos, pode variar entre 12 e 18% (LUTFI et al., 2018). Como já destacado, é reconhecida que a distribuição do VLM é influenciada pelo conteúdo de lipídio nos tecidos dos animais expostos (JIANG; XIE; LIANG, 2009). Sendo assim, a truta arco-íris tem uma maior tendência a acumular concentrações de VLM em seu filé, quando comparada à tilápia, a qual apresenta um teor de lipídio no tecido muscular de

aproximadamente 2,75% (JIM; GARAMUMHANGO; MUSARA, 2017) e ao pacu, de aproximadamente 8% (BICUDO; SADO; CYRINO, 2012). Dessa forma, quanto à questão de teor lipídico na constituição tecidual dos peixes, a comparação dos resultados obtidos no presente estudo com os apresentados por Bajc, Jenčič e Gačnik (2011) estão condizentes.

Os peixes são animais conhecidos como poiquilotérmicos, ou seja, o seu metabolismo é influenciado pela temperatura ambiente (BORCHEL et al., 2017). Ainda, é reconhecido que o aumento da temperatura acelera a absorção, distribuição e eliminação de resíduos de VM (ALDERMAN; CLIFTON-HADLEY, 1993). Portanto, provavelmente, a temperatura mais baixa (9 – 15° C) empregada no estudo de Bajc, Jenčič e Gačnik (2011) também pode ter contribuído para a observação de uma cinética de eliminação mais lenta do VM e VLM na truta arco-íris do que a apresentada no presente estudo para tilápia, mantida à temperatura de 30 ° C. Porém, ao se comparar os resultados obtidos para a truta (Bajc; Jenčič; Gačnik, 2011) com os do presente estudo envolvendo a espécie pacu, observa-se que os resultados da concentração residual ao longo do tempo para as duas espécies são similares, sendo até ligeiramente mais elevados para o filé de pacu em alguns dos períodos finais dentre os amostrados após o tratamento, como é o caso do 32º após a exposição em que a média da soma das concentrações do VM e VLM obtida para o pacu foi de 697,1 ng g⁻¹, enquanto que no 33º dia após a exposição das trutas, a média residual foi de 464,7 ng g⁻¹.

Em seu estudo, Bajc, Jenčič e Gačnik (2011), relacionam a lenta eliminação do VM e VLM à baixa temperatura da água em que os animais foram mantidos (11-15° C). Já no presente trabalho, foi observada que mesmo uma temperatura extremamente elevada (30° C) não impediu que ocorresse a persistência de concentrações altas de VM e VLM no filé de pacu. No entanto, é importante ressaltar que o peso médio dos peixes no início do estudo de Bajc, Jenčič e Gačnik (2011) era de 20,3 g, enquanto o peso médio dos pacus no início dos experimentos do presente trabalho foi de 74,2 g. Ou seja, as trutas empregadas naquele estudo eram mais jovens que os pacus utilizados neste trabalho e, conforme já destacado, os peixes mais jovens tendem a apresentar uma taxa maior de crescimento. Os referidos autores supõem que a concentração de VLM (principal contribuinte para o marcador da exposição ao VM) nas trutas reduziu devido à alta taxa de crescimento destes peixes durante o experimento, consequência de uma distribuição pelos

tecidos dos peixes. Neste sentido, tal observação corrobora o esperado de que peixes adultos precisam de um tempo maior para eliminação total de resíduos do leucometabólito do que peixes mais jovens, ainda em fase de crescimento (SUDOVA et al., 2007).

O pH também é um fator que interfere na cinética de absorção e eliminação do VM e VLM. Concentrações maiores dos resíduos dos analitos foram encontrados em peixes mantidos em água com pH mais altos (PLAKAS et al., 1996). Isto se deve ao fato de que em solução aquosa, o VM se equilibra entre duas formas: o corante na forma de sal e em sua base de carbinol (VM-carbinol), a qual é lipofílica e sem cor (Figura 21).

Figura 30. Equilíbrio entre o VM (esquerda) e sua base incolor e lipofílica, o VM-carbinol (direita), em solução aquosa.

Com o aumento da alcalinidade, o equilíbrio se desloca para a forma da base VM-carbinol (CULP; BELAND, 1996), a qual, acredita-se que seja melhor absorvida pelos peixes, devido à sua maior lipofilicidade (MAJEED et al., 2014). O pK_a do VM é igual a 6,9 (ARNOLD; LEBIZEC; ELLIS, 2008), ou seja, em condições que o pH é menor que 6,9 (pK_a , Figura 21), mais de 50% das moléculas do corante se encontram na forma iônica, o próprio VM. Quando o pH está acima do pK_a do VM, mais de 50% das moléculas estão na forma de VM-carbinol.

No estudo de Bajc, Jenčič e Gačnik (2011), o pH da água em que os peixes foram mantidos variou de 7,1 a 7,6, enquanto que no presente trabalho, os peixes foram mantidos em pH entre 6,7 a 6,8. Portanto, o pH, ainda que ligeiramente mais alto na água que manteve as trutas, provavelmente, favoreceu uma maior absorção do VM pelas mesmas, já que neste pH a concentração de VM-carbinol é maior. Uma monografia de autoria de Arnold, LeBizec e Ellis (2008) apresenta um gráfico obtido

para a relação do grau de ionização do VM com o pH, onde é possível observar que em uma faixa estreita de pH (6 a 7,5, aproximadamente), a qual, coincidentemente, abrange os pH dos dois estudos em comparação, há um significativo decaimento no grau de ionização do VM, ou seja, uma pequena alteração de pH nesta faixa causa significativo deslocamento do equilíbrio entre as espécies VM (íon) e VM-carbinol.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, em que se observou a extensão do período necessário para a eliminação de resíduos de VM a níveis de concentração abaixo do LMDR, bem como, as significativas diferenças observadas entre as espécies estudadas (44 dias para a tilápia e 342 dias para o pacu), adverte-se sobre os riscos associados decorrentes do emprego desse corante em animais destinados ao consumo humano. Neste trabalho, foram considerados alguns dos aspectos de segurança alimentar em relação ao emprego do corante verde de malaquita em animais da aquicultura, porém, há de se recordar também dos riscos de exposição humana e ambiental provenientes do descarte de resíduos da indústria têxtil, a qual também faz uso do corante VM e outros (GOPINATHAN; KANHERE; BANERJEE, 2015), o que pode agravar significativamente os riscos da exposição humana a esses compostos reconhecidamente tóxicos.

5. CONCLUSÕES

A partir da presente investigação sobre o perfil de eliminação de resíduos de verde de malaquita e seu principal metabólito toxicologicamente importante, o verde de leucomalaquita, pode-se concluir que:

- O método analítico empregando método de extração do tipo QuEChERS e sistema LC-MS/MS foi desenvolvido, aprimorado em relação aos métodos já publicados na literatura científica, e validado, atendendo aos critérios de aprovação recomendados para a finalidade a que se aplica no presente estudo;
- Os resultados dos estudos de depleção realizados com tilápias e pacu confirmaram a rápida transformação do VM ao seu metabólito mais lipofílico e persistente, o VLM;
- Como previamente relatado na literatura, a eliminação do VLM é lenta e está relacionada ao conteúdo lipídico presente no tecido animal, já que o pacu, peixe com maior teor de gordura, apresentou concentrações do metabólito significativamente mais altas que a tilápia durante o estudo e com cinética de eliminação nitidamente mais lenta do que a observada para a tilápia;
- Foi possível observar a influência de diferentes fatores como o pH e a temperatura da água, bem como, os diferentes estágios de desenvolvimento dos animais (pesos diferentes) no perfil de eliminação residual do VM e VLM, quando comparamos os resultados obtidos no presente estudo com os já reportados na literatura científica.
- A partir da extrapolação dos resultados obtidos, foi possível estimar o período mínimo necessário para cada espécie eliminar os resíduos marcadores (soma de VM e VLM) a níveis de concentração inferior ao LMDR (2 ng g^{-1}), o qual foi de 44 dias para a tilápia e 342 dias para o pacu, considerando 95% de confiança e um limite de tolerância de 99%.
- Os resultados no presente estudo apontam uma diferença significativa de perfil de eliminação residual quando da utilização do VM em diferentes espécies aquícolas, que, portanto, reiteram com base científica a importância em se ater ao risco à segurança alimentar decorrente da exposição de animais da aquicultura ao VM.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-BAKI, A.A.S.; AL-QURAIHY, S. First record of *Chilodonella* spp. (Ciliophora: Chilodonellidae) in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the central region of Saudi Arabia. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 46, n. 3, p. 657-660, 2014.
- AFROZE, S.; SEN, T.K. A review on heavy metal ions and dye adsorption from water by agricultural solid waste adsorbents. **Water Air Soil Pollut.**, v. 229:225, p. 1-50, 2018.
- ALDERMAN, D.J.; CLIFTON-HADLEY, R.S. Malachite green: a pharmacokinetic study in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v. 16, p. 297-311, 1993.
- ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
- ARNOLD, D.; LEBIZEC, B.; ELLIS, R. Malachite green: Residue evaluation of certain veterinary drugs. **FAO & JECFA Monographs**, v.6, p. 63-108, 2008.
- ASCARI, J. et al. Validation of LC-MS/MS method for malachite green (MG), leucomalachite green (LMG), crystal violet (CV) and leucocrystal violet (LCV) residues in fish and shrimp. **Food Additives & Contaminants: Part A**, p. 1-7, 2012.
- BAJC, Z.; JENČIČ, V.; GAČNIK, K. Š. Elimination of malachite green residues from meat of rainbow trout and carp after water-born exposure. **Aquaculture**, v. 321, p. 13-16, 2011.
- BARONE, R.S.C.B. et al. Fish and fishery products trade in Brazil, 2005 to 2015: a review of available data and trends. **Scientia Agricola**, v. 74, n. 5, p. 417-424, 2017.
- BERGWERFF, A.A.; KUIPER, R.V.; SCHERPENISSE, P. Persistence of residues of malachite green in juvenile eels (*Anguilla anguilla*). **Aquaculture**, v. 233, p. 55-63, 2004.
- BHATIA, D. et al. Biological methods for textile dye removal from wastewater: a review. **Critical reviews in environmental Science and technology**, v. 47, n. 19, p. 1836-1876, 2017.
- BICUDO, A.J.A.; SADO, R.Y.; CYRINO, J.E.P. Growth, body composition and hematology of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed increasing levels of ractopamine. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 5, p. 1335-1342, 2012.
- BILANDŽIĆ, N. et al. Malachite green residues in farmed fish in Croatia. **Food Control**, v. 26, p. 393-396, 2012.

BOISON, J.O.; TURNIPSEED, S.B. A review of aquaculture practices and their impacts on chemical food safety from a regulatory perspective. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 3, p. 541-549, 2015.

BORCHEL, A. et al. Identification of genes involved in cold-shock response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Genetics**, v. 96, p. 701-706, 2017.

BOWKER, J.D. et al. Effectiveness of Aquaflor (50% florfenicol) to control mortality associated with *Streptococcus iniae* in freshwater-reared subadult sunshine bass. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 22, p. 254-265, 2010.

BOWKER, J.D.; TRUSHENSKI, J.T. Mythbusters: what's real and what's not when it comes to fish drugs. **North American Journal of Aquaculture**, v. 77, p. 358-366, 2015.

BUENO, G.W. et al. Implementation of aquaculture parks in Federal Government Waters in Brazil. **Reviews in Aquaculture**, v. 7, p. 1-12, 2015.

BUENO, M.J.M. et al. Determination of malachite green residues in fish using molecularly imprinted solid-phase extraction followed by liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 665, p. 47-54, 2010.

CHA, C.J.; DOERGE, D.R.; CERNIGLIA, C.E. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella Elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4358-4360, 2001.

CHEN, L. et al. Application of graphene-based solid-phase extraction for ultra-fast determination of malachite green and its metabolite in fish tissues. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1383-1389, 2013.

CHEN, R.C. et al. Simultaneous quantification of antibiotic dyes in aquatic products and feeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 21, p. 339 – 346, 2013.

CORRÊA, B.F. et al. Efeito *in vitro* de químicos no crescimento micelial de *Saprolegnia* spp. **Ciência Rural**, v. 43, n. 6, p. 1021-1024, 2013.

CULP, S.J.; BELAND, F.A. Malachite green: a toxicological review. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 15, n. 3, p. 219-238, 1996.

CULP, S.J. et al. Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F₁ mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 122, p. 153-170, 1999.

CULP, S.J. et al. Carcinogenicity of malachite green chloride and leucomalachite green in B6C3F₁ mice and F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1204-1212, 2006.

CVM. Center for Veterinary Medicine. Enforcement priorities for drug in aquaculture. In: **Program and Procedures Manual**. 2011.

DAVID, L.H.C.; PINHO, S.M.; GARCIA, F. Improving the sustainability of tilapia cage farming in Brazil: An emergy approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 201, p. 1012-1018, 2018.

DUBREIL, E. et al. Dye residues in aquaculture products: targeted and metabolomics mass spectrometric approaches to track their abuse. **Food Chemistry**, v. 294, p. 355 – 367, 2019.

EC, European Commission. Decisão da Comissão de 22 de dezembro de 2003 que altera a Decisão 2002/657/CE relativamente à definição de limites mínimos de desempenho requeridos (LMDR) para determinados resíduos em alimentos de origem animal. 2004.

EFSA CONTAM Panel. Scientific opinion on malachite green in food. **EFSA Journal**, v. 14, n. 7, p. 4530-4580, 2016.

EMA, European Medicines Agency. Guideline on determination of withdrawal periods for edible tissues, 2018.

EMA, European Medicines Agency. VICH GL57 on Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing species: marker residue depletion studies to establish product withdrawal periods in aquatic species, 2019.

FARIAS, T.H.V. et al. Development of an indirect ELISA assay to evaluation of the adaptive immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 90, n. 4, p. 3327-3335, 2018.

FAO/WHO. 70th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) Meeting. Residues of Veterinary Drugs, 2008.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rural aquaculture: overview and framework for country reviews. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/x6941e/x6941e00.htm#Contents>>. 1998.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world of fisheries and aquaculture: meeting the sustainable development goals. 2018.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Cultured aquatic species information programme. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en>. 2019.

FDA, Food and Drug Administration. Enhanced aquaculture and seafood inspection. Report to Congress. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Seafood/ucm150954.htm#sect3>. 2008.

FDA, Food and Drug Administration. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, 2011.

FDA, Food and Drug Administration. Guidance for industry studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies, 2015.

FDA, Food and Drug Administration. Aquaculture Research. Disponível em: <https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/ScienceResearch/ucm392899.htm>. 2017.

FDA, Food and Drug Administration. Guidance for industry. General principles for evaluating the human food safety of new animal drugs used in food-producing animals, 2018.

FDA, Food and Drug Administration. Import Alert 16-124. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/cms_ia/importalert_27.html. 2018.

FRANCESCHIN, L. Infecções parasitárias e microbianas na produção do pacu *Piaractus mesopotamicus* e do híbrido patinga procedentes da região noroeste do Estado de São Paulo. **Dissertação de Mestrado em Zoologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**. Botucatu, São Paulo, 2012.

GAMMOH, S. et al. Analysis of triphenylmethane dye residues and their leuco-forms in frozen fish by LC-MS/MS, fish microbial quality, and effect of immersion in whole milk on dye removal. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 2, p. 370 – 380, 2019.

GIACCONE, V. A LC-HRMS after QuEChERS cleanup method for the rapid determination of dye residues in fish products. **Food Anal. Methods**, v. 11, p. 625 – 634, 2018.

GOPINATHAN, R.; KANHERE, J.; BANERJEE, J. Effect of malachite green toxicity on non target soil organisms. **Chemosphere**, v. 120, p. 637-344, 2015.

GREENLEES, K.J. Laboratory studies for the approval of aquaculture drugs. **The Progressive Fish-Culturists**, v. 59, p. 141-148, 1997.

GU, H. et al. Selecting the correct weighting factors for linear and quadratic calibration curves with least-squares regression algorithm in bioanalytical LC-MS/MS assays and impacts of using incorrect weightinh factors on curve stability, data quality, and assay perfo. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 8959-8966, 2014.

GUO, Q. et al. Determination of fipronil and its metabolites in chicken egg, muscle and cake by a modified QuEChERS method coupled with LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 8, p. 1543-1552, 2018.

HAN, F.; HUANG, X.; MAHUNU, G.K. Exploratory review on safety of edible raw fish per the hazard factors and their detection methods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 59, p. 37-48, 2017.

HASHIMOTO, J.C. et al. Consideration on the use of malachite green in aquaculture and analytical aspects of determining the residues in fish: a review. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 20, p. 273-294, 2011.

HASHIMOTO, D.T. et al. Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. **Reviews in Aquaculture**, v. 4, p. 108-118, 2012.

HASHIMOTO, J.C. et al. A simple method for the determination of malachite green and leucomalachite green residues in fish by a modified QuEChERS extraction and LC-MS/MS. **Journal of AOAC International**, v. 95, n.3, p. 913-922, 2012.

HONG KONG GOVERNMENT. Centre for Food Safety. Malachite Green in Foods. Disponível em: https://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_rafs/programme_rafs_fc_02_06.html. 2016

HURTAUD-PESSEL, D.; COUËDOR, P.; VERDON, E. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of dye residues in aquaculture products: Development and validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1632 – 1645, 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal, v. 43, p. 1-49, 2015.

JIANG, Y.; XIE, P.; LIANG, G. Distribution and depuration of the potentially carcinogenic malachite green in tissues of three freshwater farmed Chinese fish with diferente food habits. **Aquaculture**, v. 288, p. 1-6, 2009.

JIM, F.; GARAMUMHANGO, P.; MUSARA, C. Comparative analysis of nutritional value of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus), Nile Tilapia, meat from three diferente ecosystems. **Journal of Food Quality**, v. 2017, p. 1-8, 2017.

JOBLING, M. Nutrient partitioning and the influence of feed composition on body composition. In: HOULIHAN, D.; BOUJARD, T.; JOBLING, M. (Eds.). **Food intake in fish**. Oxford: Blackwell, p. 354-375, 2002.

KAPLAN, M.; OLGUN, E.O.; KARAOGLU, O. A rapid and simple method for simultaneous determination of triphenylmethane dye residues in rainbow trouts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1349, p. 37 – 43, 2014.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Toxicity of imine-iminium dyes and pigments: elétron transfer, radicals, oxidative stress and other physiological effects. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, p. 825-834, 2014.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L.M.M. Principais parasitoses e doenças em tilápias. **Panorama da Aqüicultura**, v. 10, n. 60, p. 39-53, 2000.

LA BASTIDE, P.Y.; NAUMANN, C.; HINTZ, W.E. Assessment of intra-specific variability in *Saprolegnia parasítica* populations of aquaculture facilities in British Columbia, Canada. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 128, p. 235-248, 2018.

LIMA, L.B. et al. Expansion of aquaculture parks and the increasing risk of non-native species invasion in Brazil. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, p. 111-122, 2018.

LÓPEZ-GUTIÉRREZ et al. Simultaneous and fast determination of malachite green, leucomalachite green, crystal violet, and brilliant green in seafood by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Anal. Methods**, v. 6, p. 406-414, 2013.

LUTFI, E. et al. Breeding selection of rainbow trout for high or low muscle adiposity differentially affects lipogenic capacity and lipid mobilization strategies to cope with food deprivation. **Aquaculture**, v. 495, p. 161-171, 2018.

MACHOVÁ, J. et al. Persistence of malachite green in tissues of rainbow trout after a long-term therapeutic bath. **Acta Vet. Brno.**, v. 65, p. 151-159, 1996.

MAJEED, S.A. et al. Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress of malachite green on the kidney and gill cell lines of freshwater air breathing fish *Channa striata*. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 21, p. 13539-13550, 2014.

MALIK, A.K.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4018-4040, 2010.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 14 de 25 de maio de 2009: Aprova os programas de controle de resíduos e contaminantes em carnes (bovina, aves, suína e equina), leite, mel, ovos e pescado para o exercício de 2009. 2009.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual da garantia da qualidade analítica. 2011.

MASIÁ, A. et al. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 936, p. 40-61, 2016.

MEINERTZ, J.R. et al. Residues of [¹⁴C]-malachite green in eggs and fry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after treatments of eggs. **Journal of Fish Diseases**, v. 18, p. 239-247, 1995.

NEBBIA, C. et al. *In vitro* interactions of malachite green and leucomalachite green with hepatic drug-metabolizing enzyme systems in the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). **Toxicology Letters**, v. 280, p. 41-47, 2017.

NEBOT, C. A simple and rapid method for the identification and quantification of malachite green and its metabolite in hake by HPLC-MS/MS. **Food control**, v. 31, p. 102 – 107, 2013.

NISKA, K. et al. Disappearance of malachite green residues in fry of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) after treatment of eggs at the hatching stage. **Aquaculture**, v. 297, p. 25-30, 2009.

OKOCHA, R.C.; OLATOYE, I.O.; ADEDEJI, O.B. Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture. **Public Health Reviews**, v. 39, p. 1-22, 2018.

PANG, Y.L.; ABDULLAH, A.Z. Current status of textile industry wastewater management and research progress in Malaysia: a review. **Clean – Soil Air Water**, v.41, p. 751-764, 2013.

PASCHOAL, J.A.R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PASCHOAL, J.A.R. et al. Depletion study and estimation of the withdrawal period for oxytetracycline in tilapia cultured in Brazil. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, p. 90-96, 2011.

PAULA, T.G. et al. Rearing temperature induces changes in muscle growth and gene expression in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 169, p. 31-37, 2014.

PEIXE BR. Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário PeixeBR da Piscicultura, 2018.

PÉREZ-SÁNCHEZ, T.; MORA-SÁNCHEZ, B.; BALCÁZAR, J.L. Biological approaches for disease control in aquaculture: advantages, limitations and challenges. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 896-903, 2018.

PIERRARD, M.A. et al. Malachite green toxicity assessed on Asian catfish primary cultures of peripheral blood mononuclear cells by a proteomic analysis. **Aquatic Toxicology**, v. 114-115, p. 142-152, 2012.

PINCINATO, R.B.M.; ASCHE, F. The development of Brazilian aquaculture: introduced and native species. **Aquaculture Economics & Management**, v. 20, n. 3, p. 312-323, 2016.

PLAKAS, S.M. et al. Uptake, tissue distribution, and metabolism of malachite green in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 53, p. 1427-1433, 1996.

PLAKAS, S.M.; DOERGE, D.R.; TURNIPSEED, S.B. Disposition and metabolism of malachite green and other therapeutic dyes in fish. In: Smith, D.J.; Gingerich, W.H.; Beconi-Barker, M.G. (eds) *Xenobiotics in Fish*. **Springer**, 1999.

RENWICK, A.; LEBLANC, J.C.; SETZER, R.W. Application of the margin of exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. Example: leucomalachite green. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 75-80, 2010.

RIBEIRO, F.M. et al. Alimentação e nutrição de pacu (*Piaractus mesopotamicus*): revisão de literatura. **Nutri Time**, v. 14, n. 1, p. 4936-4943, 2017.

ROBERTSON, E.J. et al. *Saprolegnia* – fish interactions. In: Lamour K., Kamoun S. (eds) *Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions, and research tools*. **John Wiley & Son**, Hoboken, NJ, p. 407-424, 2009.

ROCCA, L.M. et al. Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LC-MS based methods. **Food Additives & Contaminants: Part A**, p. 1-19, 2017.

RODGERS, C.J.; FURONES, M.D. Antimicrobial agentes in aquaculture: practice, needs and issues. **Options Méditerranéennes: Série A**, n. 86, p. 41-59, 2009.

SANTOS, L.; RAMOS, F. Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, p. 135-143, 2018.

SANTOS, V.B. et al. Rendimento do processamento de linhagens de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em função do peso corporal. **Ciênc. Agrotec., Lavras**, v. 31, n. 2, p. 554-562, 2007.

SANTOS, V.B. et al. Performance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* strains in Brazil: a comparison with Philippine strain. **Journal of Applied Animal Research**, v. 47, n. 1, p. 72-78, 2019.

SCHMAHL, G. et al. Effects of a medicated food containing malachite green on *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (Hymenostomatida, Ciliophora) in ornamental fish. **Parasitology Research**, v. 78, p. 183-192, 1992.

SIDONIO, L. et al. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **Agroindústria: BNDES Setorial**, v. 35, p. 421-463, 2012.

SINDAN, Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Compêndio de Produtos Veterinários SINDAN. 2016.

SINGH, G. et al. Design and characterization of a direct ELISA for the detection and quantification of leucomalachite green. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, n. 6, p. 731-739, 2011.

SONG, C. et al. Antiparasitic efficacy and safety assessment of magnolol against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish. **Aquaculture**, v. 486, p. 9-17, 2018.

SRIVASTAVA, S.; SINHA, R.; ROY, D. Toxicological effects of malachite green. **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 319-329, 2004.

SUDOVA, E. et al. Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 52, n. 12, p. 527-539, 2007.

TARBIN, J.A. et al. Multiresidue determination of triarylmethane and phenothiazine dyes in fish tissues by LC-MS/MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 625, p. 188-194, 2008.

TRUFELLI, H. et al. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, p. 491-509, 2011.

TRUSHENSKI, J.T. et al. Issues regarding the use of sedatives in fisheries and the need for immediate-release options. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 142, n. 1, p. 156-170, 2013.

TURNIPSEED, S.B. et al. Application and evaluation of a high-resolution mass spectrometry screening method for veterinary drug residues in incurred fish and

imported aquaculture samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 5529-5544, 2018.

UNITED NATIONS. World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables. **Department of Economic and Social Affairs**, 2015.

VALLE, L. et al. Determination of the sum of malachite green and leucomalachite green in salmon muscle by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 101-105, 2005.

VARGAS, R.J. et al. Resposta fisiológica à infestação experimental com *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876) em alevinos de Jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy e Gaimard, 1824) previamente alimentados com diferentes fontes lipídicas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 81-86, 2008.

VYAVAHARE, G.D. et al. Response surface methodology optimization for sorption of malachite green dye on sugarcane bagasse biochar and evaluating the residual dye for phyto and cytogenotoxicity. **Chemosphere**, v. 194, p. 306-315, 2018.

YONAR, M.E.; YONAR, S.M. Changes in selected immunological parameters and antioxidante status of rainbow trout exposed to malachite green (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, p. 19-23, 2010.

ZANELLA, R. et al. QuEChERS. In: Preparo de amostras para análises de compostos orgânicos, p. 230-244, 2015.

7. ANEXO

ANEXO I. Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Jaboticabal.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Câmpus de Jaboticabal
---	---	--	---

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação da eliminação de resíduos de verde de malaquita em pescados empregando LC-MS/MS"**, protocolo nº 009707/18, sob a responsabilidade da Profª Drª Fabiana Pilarski, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 05 de julho de 2018.

Vigência do Projeto	16/08/2018 a 16/10/2018
Espécie / Linhagem	<i>Piaractus mesopotamicus</i> (Pacu); <i>Oreochromis niloticus</i> (Tilápia)
Nº de animais	180 animais (90 de cada espécie)
Peso / Idade	100 g
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Piscicultura Comercial

Jaboticabal, 05 de julho de 2018.

Prof Dr Everton Cid Rigobelo
 Vice-Coordenador – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
 Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
 tel 16 3209 7100 - www.fca.unesp.br

8. APÊNDICES

Tabela 18. Resultados analíticos das amostras de filé (carne + pele) de tilápia (continua).

Abate das Tilápias		Peso (g)	Concentração do Resíduo Marcador (ng g ⁻¹)		
			VM	VLM	SOMA
24 horas após o tratamento	1	124,1	12,75	234,33	247,08
	2	130,1	33,89	361,44	395,33
	3	104,8	22,03	316,72	338,75
	4	96	19,01	308,13	327,14
	5	134,8	19,65	233,74	253,39
	6	91,3	43,83	388,22	432,05
	7	96,2	5,79	180,07	185,86
	8	103,7	7,10	186,56	193,66
	9	113,2	4,96	171,60	176,56
	10	-	24,91	280,11	305,02
	<i>Média</i>	110,5	19,4	266,1	285,5
	<i>Mínimo</i>	91,3	5,0	171,6	176,6
	<i>Máximo</i>	134,8	43,8	388,2	432,1
	<i>Desvio</i>	15,9	12,6	76,9	89,0
	<i>CV (%)</i>	14,4	65,0	28,9	31,2
72 horas após o tratamento	1	103,2	1,51	105,55	107,06
	2	126,7	3,01	158,75	161,76
	3	94,4	1,79	86,51	88,30
	4	148,4	1,55	101,16	102,71
	5	84,8	1,79	134,78	136,57
	6	136,5	1,16	89,10	90,26
	7	95	1,45	66,34	67,79
	8	132,1	1,47	91,69	93,16
	9	133,4	1,91	114,88	116,79
	10	105,7	1,21	68,54	69,75
	<i>Média</i>	116,0	1,7	101,7	103,4
	<i>Mínimo</i>	84,8	1,2	66,3	67,8
	<i>Máximo</i>	148,4	3,0	158,8	161,8
	<i>Desvio</i>	21,9	0,5	28,7	29,1
	<i>CV (%)</i>	18,8	30,2	28,2	28,1

(continuação da Tabela 18)

Abate das Tilápias		Peso (g)	Concentração do Resíduo Marcador (ng g ⁻¹)		
			VM	VLM	SOMA
120 horas após o tratamento	1	167,7	0,94	59,07	60,01
	2	115,2	0,90	69,49	70,39
	3	125,1	0,64	38,46	39,10
	4	148	0,88	69,46	70,34
	5	138,9	0,85	52,39	53,24
	6	137,8	0,76	128,43	129,19
	7	117,3	1,06	66,63	67,69
	8	100,1	1,14	136,83	137,97
	9	122,3	0,75	37,85	38,60
	10	153,4	0,93	81,87	82,80
	<i>Média</i>	132,6	0,9	74,1	74,9
	<i>Mínimo</i>	100,1	0,6	37,9	38,6
	<i>Máximo</i>	167,7	1,1	136,8	138,0
	<i>Desvio</i>	20,3	0,1	33,9	34,0
	<i>CV (%)</i>	15,3	18,1	45,7	45,3
264 horas após o tratamento	1	159,2	< LOQ	55,22	55,47
	2	123,2	< LOQ	46,67	46,92
	3	142,4	< LOQ	8,81	9,06
	4	125,7	< LOQ	46,70	46,95
	5	133,3	< LOQ	11,95	12,20
	6	142	< LOQ	21,27	21,52
	7	123,8	< LOQ	13,89	14,14
	8	153,2	< LOQ	25,86	26,11
	9	97,1	< LOQ	24,08	24,33
	10	143,1	< LOQ	45,54	45,79
	<i>Média</i>	134,3	< LOQ	30,0	30,0
	<i>Mínimo</i>	97,1	-	8,8	8,8
	<i>Máximo</i>	159,2	-	55,2	55,2
	<i>Desvio</i>	17,9	-	17,0	17,0
	<i>CV (%)</i>	13,3	-	56,6	56,6

(continuação da Tabela 18)

Abate das Tilápias		Peso (g)	Concentração do Resíduo Marcador (ng g ⁻¹)		
			VM	VLM	SOMA
408 horas após o tratamento	1	154,8	< LOQ	34,9	35,2
	2	153,2	< LOQ	23,2	23,5
	3	163,5	< LOQ	4,6	4,8
	4	129	< LOQ	10,7	10,9
	5	142,8	< LOQ	31,3	31,6
	6	149	< LOQ	29,1	29,4
	7	145,4	< LOQ	19,1	19,4
	8	121	< LOQ	23,3	23,5
	9	145,9	< LOQ	11,4	11,6
	10	114,4	< LOQ	8,4	8,6
	Média	141,9	< LOQ	19,6	19,6
	Mínimo	121,0	-	4,6	4,6
	Máximo	163,5	-	34,9	34,9
504 horas após o tratamento	Desvio	15,6	-	10,5	10,5
	CV (%)	11,0	-	53,4	53,4
	1	158,5	< LOQ	20,3	20,6
	2	107,2	< LOQ	8,7	8,9
	3	133,4	< LOQ	12,3	12,6
	4	115,8	< LOQ	2,9	3,1
	5	96,1	< LOQ	2,7	3,0
	6	169,6	< LOQ	4,6	4,8
	7	142,9	< LOQ	11,3	11,5
	8	130,2	< LOQ	3,3	3,6
	9	147,6	< LOQ	4,8	5,1
	10	127,8	< LOQ	4,7	4,9
	Média	132,9	< LOQ	7,6	7,6
	Mínimo	96,1	-	2,7	2,7
	Máximo	169,6	-	20,3	20,3
	Desvio	22,8	-	5,7	5,7
	CV (%)	17,1	-	74,9	74,9

(conclusão da Tabela 18)

Abate das Tilápias		Peso (g)	Concentração do Resíduo Marcador (ng g ⁻¹)		
			VM	VLM	SOMA
624 horas após o tratamento	1	159	< LOQ	5,3	5,6
	2	207,5	< LOQ	4,0	4,2
	3	128,4	< LOQ	5,6	5,8
	4	148	< LOQ	7,3	7,6
	5	133,6	< LOQ	10,1	10,2
	6	145,9	< LOQ	3,4	3,5
	7	117,5	< LOQ	5,4	5,6
	8	184,6	< LOQ	11,4	11,7
	9	107,1	< LOQ	7,6	7,7
	10	173,3	< LOQ	2,1	2,3
	Média	150,5	< LOQ	6,2	6,2
	Mínimo	107,1	-	2,1	2,1
	Máximo	207,5	-	11,4	11,4
768 horas após o tratamento	Desvio	31,2	-	2,9	2,9
	CV (%)	20,8	-	46,9	46,9
	1	176,5	< LOQ	1,7	2,0
	2	137,5	< LOQ	1,6	1,8
	3	170,4	< LOQ	1,7	1,9
	4	149,2	< LOQ	1,1	1,3
	5	171,3	< LOQ	3,1	3,4
	6	175,6	< LOQ	0,9	1,0
	7	132,2	< LOQ	0,8	1,1
	8	180,4	< LOQ	1,1	1,4
	9	159,1	< LOQ	0,6	0,8
	10	178	< LOQ	4,7	4,8
	Média	163,0	< LOQ	1,7	1,7
	Mínimo	132,2	-	0,6	0,6
	Máximo	180,4	-	3,1	3,1
	Desvio	17,6	-	1,3	1,3
	CV (%)	10,8	-	72,3	72,3

Tabela 19. Resultados analíticos das amostras de filé (carne + pele) de pacu (continua).

Abate dos Pacus		Peso (g)	Concentração do Resíduo Marcador (ng g ⁻¹)		
			VM	VLM	SOMA
24 horas após o tratamento	1	82,6	597,2	1976,4	2573,6
	2	91,3	105,2	1510,0	1615,2
	3	77,1	174,8	1547,4	1722,1
	4	73,6	55,6	1671,5	1727,1
	5	71	65,4	1626,3	1691,6
	6	68,9	139,0	1860,4	1999,4
	7	60,7	180,3	1727,2	1907,4
	8	90,2	622,3	2661,4	3283,6
	9	67	42,8	832,2	875,0
	10	59,8	314,9	2204,2	2519,1
	<i>Média</i>	74,2	229,8	1761,7	1991,4
	<i>Mínimo</i>	59,8	42,8	832,2	875,0
	<i>Máximo</i>	91,3	622,3	2661,4	3283,6
	<i>Desvio</i>	11,1	215,5	478,7	659,5
	<i>CV (%)</i>	14,9	93,8	27,2	33,1
72 horas após o tratamento	1	69,4	31,6	1269,0	1300,7
	2	84,3	21,6	1549,2	1570,8
	3	93,5	24,0	1080,5	1104,5
	4	93,3	59,5	1494,1	1553,6
	5	76,4	24,3	1365,0	1389,3
	6	80,8	13,1	737,4	750,6
	7	63,2	31,8	1837,6	1869,5
	8	109	34,2	782,2	816,4
	9	71,1	10,6	617,8	628,4
	10	83,7	18,1	1223,7	1241,8
	<i>Média</i>	82,5	26,9	1195,7	1222,6
	<i>Mínimo</i>	63,2	10,6	617,8	628,4
	<i>Máximo</i>	109,0	59,5	1837,6	1869,5
	<i>Desvio</i>	13,6	13,9	392,9	399,8
	<i>CV (%)</i>	16,5	51,7	32,9	32,7

(continuação da Tabela 19)

Abate dos Pacus		Peso (g)	Concentração do Resíduo Marcador (ng g ⁻¹)		
			VM	VLM	SOMA
120 horas após o tratamento	1	85,2	11,8	712,0	723,8
	2	62,3	19,3	1653,7	1673,0
	3	66,4	12,8	1099,4	1112,1
	4	70,1	20,4	2189,8	2210,2
	5	89,1	35,0	2274,9	2309,9
	6	80,5	26,4	1886,6	1912,9
	7	73,4	23,9	1699,9	1723,8
	8	84,4	38,3	1757,5	1795,8
	9	88,9	26,4	1750,9	1777,3
	10	80,1	27,0	1908,9	1935,9
	<i>Média</i>	78,0	24,1	1693,4	1717,5
	<i>Mínimo</i>	62,3	11,8	712,0	723,8
	<i>Máximo</i>	89,1	38,3	2274,9	2309,9
	<i>Desvio</i>	9,5	8,5	470,6	476,7
	<i>CV (%)</i>	12,2	35,4	27,8	27,8
264 horas após o tratamento	1	64,7	12,3	671,0	683,2
	2	86,5	10,8	1139,3	1150,1
	3	58,8	9,9	947,1	956,9
	4	79	10,1	754,9	764,9
	5	72,9	7,4	1217,1	1224,4
	6	81,2	10,7	1107,8	1118,4
	7	92,6	11,9	1035,4	1047,3
	8	81	14,9	1599,7	1614,6
	9	64,1	12,8	1052,0	1064,8
	10	73	10,6	1195,9	1206,5
	<i>Média</i>	75,4	11,1	1072,0	1083,1
	<i>Mínimo</i>	58,8	7,4	671,0	683,2
	<i>Máximo</i>	92,6	14,9	1599,7	1614,6
	<i>Desvio</i>	10,7	2,0	258,1	258,7
	<i>CV (%)</i>	14,2	18,0	24,1	23,9

(continuação da Tabela 19)

Abate dos Pacus		Peso (g)	Concentração do Resíduo Marcador (ng g ⁻¹)		
			VM	VLM	SOMA
408 horas após o tratamento	1	91,6	4,3	1082,7	1087,0
	2	74,7	4,4	1536,7	1541,1
	3	81,7	3,1	715,9	719,0
	4	84,5	2,7	586,4	589,1
	5	67,3	3,1	1463,2	1466,3
	6	92,7	2,7	1108,5	1111,1
	7	71,8	3,6	833,0	836,5
	8	100,7	3,3	1520,6	1523,8
	9	100,3	3,3	1493,4	1496,7
	10	103,8	3,1	1449,0	1452,1
	<i>Média</i>	86,9	3,4	1178,9	1182,3
	<i>Mínimo</i>	67,3	2,7	586,4	589,1
	<i>Máximo</i>	103,8	4,4	1536,7	1541,1
	<i>Desvio</i>	12,9	0,6	364,7	364,8
	<i>CV (%)</i>	14,9	17,5	30,9	30,9
504 horas após o tratamento	1	104,4	3,0	1071,8	1074,8
	2	95	1,4	1165,1	1166,5
	3	114,5	1,5	1470,9	1472,4
	4	58,8	2,1	1152,4	1154,5
	5	73,5	2,2	821,7	823,9
	6	89,5	2,8	1356,7	1359,6
	7	103,5	2,4	1115,3	1117,7
	8	87,8	3,8	2002,9	2006,8
	9	81,7	2,1	931,3	933,4
	10	84,8	3,2	1426,8	1430,1
	<i>Média</i>	89,4	2,5	1251,5	1254,0
	<i>Mínimo</i>	58,8	1,4	821,7	823,9
	<i>Máximo</i>	114,5	3,8	2002,9	2006,8
	<i>Desvio</i>	16,2	0,8	335,0	335,4
	<i>CV (%)</i>	18,1	30,8	26,8	26,7

(conclusão da Tabela 19)

Abate dos Pacus		Peso (g)	Concentração do Resíduo Marcador (ng g ⁻¹)		
			VM	VLM	SOMA
624 horas após o tratamento	1	78,5	1,7	375,0	376,7
	2	103,1	1,8	608,7	610,5
	3	95,5	1,8	443,1	444,9
	4	98	1,3	360,5	361,8
	5	81,8	2,5	707,0	709,5
	6	96,3	1,8	579,7	581,5
	7	109,7	2,1	757,3	759,3
	8	112	1,7	330,5	332,2
	9	84,7	1,9	537,8	539,7
	10	67	2,2	978,4	980,6
	<i>Média</i>	92,7	1,9	567,8	569,7
	<i>Mínimo</i>	67,0	1,3	330,5	332,2
	<i>Máximo</i>	112,0	2,5	978,4	980,6
	<i>Desvio</i>	14,4	0,3	205,1	205,3
	<i>CV (%)</i>	15,5	17,3	36,1	36,0
768 horas após o tratamento	1	121,9	1,1	555,2	556,3
	2	93	1,6	726,9	728,5
	3	99,9	1,6	806,0	807,6
	4	79,6	2,9	982,1	985,0
	5	110,2	1,9	792,1	794,0
	6	92,8	0,9	416,9	417,8
	7	74,2	2,0	655,4	657,4
	8	87,4	2,4	582,9	585,3
	9	99,9	2,3	787,9	790,2
	10	85,7	1,5	647,5	649,0
	<i>Média</i>	94,5	1,8	695,3	697,1
	<i>Mínimo</i>	74,2	1,1	416,9	417,8
	<i>Máximo</i>	121,9	2,9	982,1	985,0
	<i>Desvio</i>	14,2	0,6	158,8	159,3
	<i>CV (%)</i>	15,1	33,5	22,8	22,9