UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de método analítico empregando QuEChERS
para a determinação simultânea de resíduos multiclassas de
fármacos veterinários em pescados**

Marina Alves Damaceno

**Ribeirão Preto
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de método analítico empregando QuEChERS para a
determinação simultânea de resíduos multiclasses de fármacos veterinários
em pescados**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia

Orientado: Marina Alves Damaceno

Orientador (a): Prof. Dr. Jonas Augusto
Rizzato Paschoal

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 19/09/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2017

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.

Damaceno, A. Marina

Desenvolvimento de método analítico empregando QuEChERS para a determinação simultânea de resíduos multiclasses de fármacos veterinários em pescados. Ribeirão Preto, 2017.

98 p.; 30 cm.

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

Orientador: Paschoal, Jonas Augusto Rizzato.

1. Antibacterianos 2. Antiparasitários. 3. Piscicultura. 4. LC-MS/MS. 5. QuEChERS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Marina Alves Damaceno

Título do trabalho: Desenvolvimento de método analítico empregando QuEChERS para a determinação simultânea de resíduos multiclassés de fármacos veterinários em pescados.

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais Aparecido e Marly, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo de minha vida. Desejo ser merecedora dos esforços dedicado por vocês em todos os aspectos, especialmente quanto à minha formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente em minha vida, renovando minha fé e dando forças para seguir em frente.

A minha família, por ter lutado para que eu pudesse estudar, por sempre estar presente na minha vida, por ter me apoiado na minha escolha profissional e por ter me ajudado em todos os momentos.

Ao Carlos Eduardo pelo amor, apoio e compreensão. Obrigado por estar comigo nos momentos bons e também nas horas difíceis. Você é muito especial para mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jonas A. R. Paschoal, pelo aceite em me orientar, pelo apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho, pela paciência, pelo incentivo e por contribuir de maneira imensurável na minha formação acadêmica.

Ao técnico do laboratório, Agnaldo, pelo apoio, amizade, companheirismo e pelo auxílio nas idéias, análises e experimentos.

Aos amigos da faculdade, Rodolfo, Ana Paula, Pedro, João, Zenaís, Carlos, Andréia, Camila e Luciana pelos bons momentos, ajuda, troca de experiências, discussões e conhecimentos. Em especial, agradeço a Carol e Juliana pelo companheirismo, amizade e pelos momentos de descontração e alegria.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Física e Química e ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia pela possibilidade de desenvolver este projeto.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação. Obrigada por toda ajuda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e bolsa concedida durante a realização do mestrado.

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

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Damaceno, A. M. Desenvolvimento de método analítico para determinação simultânea de medicamentos veterinários multiclasses em pescados utilizando LC-MS. 2017. 98p . Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A aquicultura é um dos sistemas de produção de alimentos com maior crescimento no mundo todo. Reconhecidamente, os sistemas intensivos de produção animal para alimentos são favoráveis à propagação de doenças infecciosas devido à alta densidade populacional. Por esta razão, antimicrobianos (antibacterianos e antiparasitários) são largamente empregados na medicina veterinária, sendo que os resíduos destes podem permanecer nos alimentos de origem animal, acima de valores considerados seguros, quando não são respeitadas as boas práticas veterinárias. Este trabalho teve por objetivos: (i) desenvolver e avaliar o desempenho de um método analítico para a determinação simultânea de resíduos de quinolonas (enrofloxacina, ciprofloxacina e difloxacinas), tetraciclina (clortetraciclina, tetraciclina e oxitetraciclina), sulfonamidas (sulfadimetoxina, sulfametazina e sulfatiazol) e bezimidazóis (albendazol) em filés de duas espécies de peixe (tilápia e pacu) de importância comercial no Brasil, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas; (ii) aplicar o método nas análises de amostras de filés de peixes disponíveis comercialmente. O procedimento de preparação da amostra baseou-se no método QuEChERS. Foram avaliadas as influências da composição e volume da solução extratora empregada, variação dos sais utilizados no processo de *salting-out* e sorventes empregados na etapa de limpeza, visando-se obter a maior eficiência de extração simultânea dos fármacos de interesse em filé de pacu e tilápia. A melhor condição do método de extração foi: 5 g de filé de peixe homogeneizado; 10 mL de ACN:MeOH 1% de ácido fórmico como solvente extrator; 2 g de sulfato de magnésio e 0,5 g de cloreto de sódio; 150 mg mL⁻¹ de sulfato de magnésio e 25mg mL⁻¹ de PSA e C₁₈ para a etapa de limpeza. As eficiências de extração obtidas para todos os resíduos variaram de 70 a 100%. Para a separação cromatográfica, foi empregada fase móvel composta por água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambas contendo 0,5% de ácido fórmico, sob eluição por gradiente. Como fase estacionária, empregou-se a coluna XTerra C₁₈ MS de dimensões 100 x 3,9 mm, 3.5

µm. Foi utilizado um sistema de ionização por eletronebulização operando em modo positivo (ESI+), na interface entre o sistema cromatográfico e o espectrômetro de massas, sendo este composto por analisadores de massas do tipo triplo-quadrupolo operando no modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM – *Multiple Reaction Monitoring*). Nestas condições foi possível o monitoramento dos 10 analitos em uma corrida analítica com duração de 14 minutos. O desempenho do método foi avaliado mediante os seguintes parâmetros de validação: seletividade, linearidade, precisão, veracidade/recuperação limites de decisão e capacidade de detecção. Todos os resultados obtidos para os parâmetros avaliados atendem aos critérios de aceitação propostos pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica para Resíduos e Contaminantes em Alimentos, proposto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o que qualifica o método desenvolvido para os objetivos propostos no presente trabalho. O método foi aplicado na análise de 20 amostras de filés de peixes de ambas as espécies, adquiridas na cidade de Ribeirão Preto, SP. Todas as amostras analisadas não apresentaram resíduos dos fármacos alvo em níveis detectáveis pelo método empregado.

Palavras-chave: antibacterianos, antiparasitários, aquicultura, LC-MS/MS, QuEChERS.

ABSTRACT

Damaceno, A. M. Development of an analytical method for simultaneous determination of multiclass veterinary drugs in fish using LC-MS. 2017. 98p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Aquaculture is one of the fastest growing food production system in the world. Admittedly, the practice of intensive systems of animal food production could lead to the spread of infectious diseases due to the high population density. For this reason, antimicrobials (antibacterials and antiparasitics) are widely used in veterinary medicine, and residues are in animal foods, above safe, when they are not respected as good veterinary practices. The aim of this Project was (i) develop and validated a analytical method for the simultaneous determination of residues of quinolonolones (enrofloxacin, ciprofloxacin and difloxacin), tetracyclines (chlortetracycline, tetracycline and oxitetracilina), sulfonamides (sulfadimethoxine, sulfamethazine and sulfathiazole) and bezimadazóis (albendazole) in fillet two species of fish (tilapia and pacu) of commercial importance in Brazil, employing high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry; (li) Apply the method in analyses of sample fillet of fish commercially available. The sample preparation procedure was based on the QuEChERS method. The influence of the composition and volume of the extractive solution used, variation of the salts used in the salting-out process and sorbents used in the cleaning step were evaluated, aiming to obtain the highest efficiency of simultaneous extraction of the drugs of interest in pacu and tilapia fillet. The best condition of the extraction method was: 5 g of homogenized fish fillet; 10 mL of ACN: MeOH 1% formic acid as the extractive solvent; 2 g of magnesium sulfate and 0.5 g of sodium chloride; 150mg mL⁻¹ of MgSO₄, 25mg mL⁻¹ of PSA and 25mg mL⁻¹ C18 for the cleaning step. The extraction efficiencies obtained for all residues ranged from 70 to 100%. For a chromatographic separation, the mobile phase was used composed of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B), both containing 0.5% formic acid, under gradient elution. As the stationary phase, the XTerra C₁₈ MS column of dimensions 10 x 2.1 mm, 3.5 µm was used. one by eletronebulização ionization system at the interface between the chromatography system and mass spectrometry operating in positive mode was used (ESI +), with mass analyzers triple-quadrupole operating in Multiple Reaction Monitoring Mode

(MRM - Reaction Multiple Monitoring). Under these conditions it was possible to monitor the 10 analytes in an analytical run of 14 minutes. The method was evaluated through the validation requirements: selectivity, linearity, precision, veracity / recovery decision limits and detection capacity. All the results obtained for the quality assurance system for Food Residues and Contaminants, proposed by Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, approved the developed method for the proposed objectives at this work. The method was applied to analysis of 20 samples of fish fillets from embassies as species, acquired in the retail market of Ribeirão Preto, SP. All analyzed samples showed no residues of the drugs above detectable levels by the method employed.

Key words: antibacterial, antiparasitic, aquaculture, LC-MS / MS, Quechers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química das sulfonamidas.....	25
Figura 2.	Estrutura química das quinolonas.....	27
Figura 3.	Estrutura química das tetraciclinas.....	28
Figura 4.	Estrutura química do albendazol	30
Figura 5.	Representação esquemática do processo de extração ..	42
Figura 6.	Cromatograma característico da amostra branco fortificada com os fármacos e PI (FNC) na concentração de 50 ng g ⁻¹ após procedimento de extração	53
Figura 7.	Avaliação do solvente de extração em termos de recuperação	55
Figura 8.	Avaliação do volume do solvente de extração	56
Figura 9.	Avaliação da influência dos sais no processo de extração.....	57
Figura 10.	Avaliação do sorvente utilizado na limpeza do extrato.....	59
Figura 11.	Representação esquemática do processo de extração otimizado dos analitos em filé de tilapia.....	60
Figura 12.	Cromatogramas característicos para amostras branco e amostra branco fortificada de filé de tilápia, com os fármacos (50 ng g ⁻¹) e com a FNC (PI) (100 ng g ⁻¹).....	61
Figura 13.	Cromatogramas característicos para amostras branco e amostra branco fortificada de filé de pacu, com os fármacos (50 ng g ⁻¹) e com a FNC (100 ng g ⁻¹).....	68

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Medicamentos veterinários aprovados para uso na aquicultura brasileira	22
Tabela 2.	Valores de LMR estabelecidos pelo MAPA	32
Tabela 3.	Trabalhos descrito na literatura para determinação de fármacos em filé de peixe	34
Tabela 4.	Concentrações utilizadas para curva de calibração analítica	45
Tabela 5.	Critérios para aceitação da precisão	47
Tabela 6.	Faixa de recuperação (%) aceita pelo MAPA	48
Tabela 7.	Condições otimizadas de ionização e detecção dos fármacos pelo sistema ESI-MS/MS	51
Tabela 8.	Janela de detecção e composição da fase móvel em eluição por gradiente	52
Tabela 9.	Linearidade, Repetitividade, Precisão intermediária, Recuperação, CC α e CC β do método para análise dos fármacos com LMR 100 ng g ⁻¹ em filé de tilápia	63
Tabela 10.	Linearidade, Repetitividade, Precisão intermediária, Recuperação, CC α e CC β do método para análise dos fármacos com LMR 200 ng g ⁻¹ e 300 ng g ⁻¹ em filé de tilápia	66
Tabela 11.	Efeito Matriz em filé de tilápia	67
Tabela 12.	Efeito Matriz em filé de pacu	71
Tabela 13.	Linearidade, Repetitividade, Precisão intermediária, Recuperação, CC α e CC β do método para análise dos	

fármacos com LMR 100 ng g⁻¹ em filé de pacu72

Tabela 14.	Linearidade, Repetitividade, Precisão intermediária, Recuperação, CC α e CC β do método para análise dos fármacos com LMR 200 ng g ⁻¹ 300 ng g ⁻¹ em filé de pacu	73
------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABZ	Albendazol
ACN	Acetonitrila
C ₁₈	Octadecilsilano
CC α	Limite de Decisão
CC β	Capacidade de Detecção
CIP	Ciprofloxacina
CTC	Clortetraciclina
CV	Coeficiente de variação
dSPE	Extração em Fase Sólida Dispersiva (<i>dispersive Solid Phase Extraction</i>)
DIF	Difloxacina
ENR	Enrofloxacin
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FNC	Fenacetina
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
GC	Cromatografia gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IDA	Ingestão diária aceitável

LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (<i>Liquid Chromatography with mass spectrometry in tandem</i>)
LLE	Extração líquido-líquido (<i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LMR	Limite Máximo de Resíduos
MAE	Extração Assistida por Microondas (<i>Microwave-Assisted Extraction</i>)
MAPA	Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MSPD	Dispersão da Matriz em Fase Sólida (<i>Matrix Solid Phase Dispersion</i>)
NaCl	Cloreto de Sódio
OXT	Oxitetraciclina
PAMVET	Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos
PI	Padrão Interno
PLE	Extração Líquida Pressurizada (<i>Pressurized Liquid Extraction</i>)
PNCRC	Programa Nacional de Controle de Análise de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal
PSA	Amina Primária e Secundária (<i>Primary Secondary Amine</i>)
QN	Quinolonas
QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)

r	Coeficiente de correlação linear
Rec	Recuperação
SBSE	Extração Sortiva em Barras de Agitação (<i>Pressurized Liquid Extraction</i>)
SDM	Sulfadimetoxina
SF	Sulfonamidas
SFE	Extração com Fluido Supercrítico (<i>Supercritical Fluid Extraction</i>)
SMT	Sulfametazina
SPE	Extração em Fase Sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração em Fase Sólida (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
STZ	Sulfatiazol
TTC	Tetraciclina
v/v	Volume/volume

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. AQUICULTURA	19
1.2. USO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS NA AQUICULTURA	21
1.2.1. <i>Antibacterianos de uso animal</i>	24
1.2.2. <i>Antiparasitário de uso animal</i>	29
1.3. LEGISLAÇÃO VIGENTE SOBRE O USO DE MEDICAMENTOS NA PISCICULTURA	31
1.4. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS UTILIZADOS NA PISCICULTURA	32
1.4.1 <i>QuEChERS</i>	35
2. OBJETIVOS.....	38
2.1 OBJETIVO GERAL	38
2.2 ETAPAS	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 EQUIPAMENTOS	39
3.2 REAGENTES E ACESSÓRIOS.....	39
3.3 SOLUÇÕES PADRÃO	40
3.4 SOLUÇÕES DE TRABALHO	41
3.5 AMOSTRAS BRANCO DE FILÉ DE PEIXE.....	41
3.6 EXTRAÇÃO DOS FÁRMACOS UTILIZANDO O MÉTODO QUECHERS.....	41
3.7 CONDIÇÕES LC-MS/MS.....	43
3.8 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO DO MÉTODO DESENVOLVIDO	43
3.8.1 <i>Seletividade e efeito matriz</i>	44
3.8.2 <i>Linearidade</i>	45
(*) <i>Nível de concentração da curva analítica correspondente ao LMR de cada fármaco em filé de peixe</i>	45
3.8.3 <i>Precisão</i>	46
3.8.4 <i>Veracidade/Recuperação</i>	47
3.8.5 <i>Limite de Decisão (CCα) e Capacidade de Detecção (CCβ)</i>	48
3.9 AMPLIAÇÃO DO ESCOPO ANALÍTICO	49
3.10 AMOSTRAS ANALISADAS	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES LC-MS/MS.....	50
4.2 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO.....	53
4.2.1 <i>Seleção do solvente de extração</i>	54
4.2.2 <i>Seleção do volume do solvente de extração</i>	55
4.2.3 <i>Seleção dos sais utilizados na etapa de salting out</i>	56
4.2.4 <i>Seleção do sorvente utilizado na etapa de limpeza do extrato</i>	58
4.2.5 <i>Método de extração por QuEChERS nas condições definidas</i>	59
4.3 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO DO MÉTODO DESENVOLVIDO EM FILÉ DE TILÁPIA	61
4.3.1 <i>Seletividade e efeito matriz</i>	61
4.3.2 <i>Curvas analíticas e linearidades</i>	64
4.3.3. <i>Precisão</i>	64
4.3.4 <i>Veracidade/Recuperação</i>	64
4.3.5 <i>Limite de Decisão (CCα) e Capacidade de Detecção (CCβ)</i>	65

4.4 AMPLIAÇÃO DO ESCOPO ANALÍTICO	68
4.4.1 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO DO MÉTODO DESENVOLVIDO EM FILÉ DE PACU	68
4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO	74
5. CONCLUSÃO.....	75
6. REFERÊNCIAS	76
APÊNDICES.....	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aquicultura

A aquicultura consiste na criação de organismos cujo ciclo de vida em condições naturais se dá total ou parcialmente em meio aquático, podendo ser tanto continental (água doce) quanto marinha (água salgada). Esta atividade abrange diversas especialidades, como a piscicultura (criação de peixes), malacocultura (criação de moluscos como ostras, mexilhões, caramujos e vieiras), carcinicultura (criação de camarão), algicultura (cultivo de macro ou microalgas), ranicultura (criação de rãs) e jacaricultura (criação de jacarés) (SEPAQ, 2014).

A produção mundial de pescado tem crescido à taxa média anual de 3,2% nos últimos 50 anos, superando o crescimento populacional do mesmo período em 1,6%. Neste contexto, o consumo per capita aparente de pescado passou de 9,9 kg por ano, registrado para a década de 1960, para 19,2 kg por ano em 2012. O desenvolvimento do setor pode ser atribuído a fatores como o crescimento demográfico, aumento da renda e da urbanização, surgimento de canais de distribuição mais eficientes e, principalmente, pela significativa mundial expansão da aquicultura (FAO, 2014).

A produção aquícola nacional ainda apresenta números incipientes se comparada a dos maiores produtores mundiais, como a China, a Índia, o Vietnã e a Indonésia (FAO, 2014). Contudo, dentre os países com maior potencial para a expansão da aquicultura, o Brasil tem papel de destaque (BRASIL, 2013a), visto que o país conta com características favoráveis ao desenvolvimento das mais diversas modalidades aquícolas. Por exemplo, o país detém 12% da água doce mundial, dispõe de 5,5 milhões de hectares de lâmina d'água em reservatórios públicos, um litoral de 8.500 km de extensão, clima tropical na maior parte do território, o que permite a criação de grande diversidade de espécies com potencial zootécnico e mercadológico. Tais atributos credenciam o país a aumentar a oferta de pescado nos próximos anos, condição corroborada por sua taxa média de crescimento da

aquicultura superior a 10% ao ano na última década (BRASIL, 2013a; BRASIL, 2013b).

A especialidade que mais se destaca na aquicultura é a piscicultura. Em 2016, a aquicultura brasileira continuou crescendo e atingiu um valor de produção de R\$ 4,61 bilhões, com a maior parte (70,9%) oriunda da criação de peixes (IBGE, 2016).

A piscicultura brasileira é representada em mais de 80% pelas tilápias e pelo grupo dos peixes redondos, em que se inclui o pacu (SEBRAE, 2015).

A tilápia é a espécie mais criada no Brasil, com 239,09 mil toneladas despescadas em 2016, representando quase metade (47,1%) do total da piscicultura (IBGE, 2016). O reconhecido bom desempenho da criação de tilápias é atribuído a sua característica de rusticidade, taxa de crescimento, facilidade de reprodução e excelentes características organolépticas (KUBITZA, 2000).

O pacu faz parte do grupo dos peixes redondos e sua criação comercial vem crescendo devido ao sabor de sua carne, o baixo custo de manutenção, a resistência a patógenos, a baixa exigência quanto à qualidade da água e pela alta adaptabilidade ao cultivo em tanques e viveiros (ABIMORAD *et al.*, 2004; JOMORI *et al.*, 2008). O pacu também é muito utilizado para obtenção do híbrido tambacú, quando cruzado com o tambaqui. O tambacú combina características desejáveis como a resistência ao frio e a rusticidade do pacu (Martins *et al.*, 2002), representando grande importância econômica na piscicultura brasileira. Em comparação com outras espécies nativas capturadas na natureza, o filé de pacu foi o mais calórico em função do maior teor de lipídios totais (19,83%) (RAMOS *et al.*, 2008).

De maneira geral, os sistemas de criação de peixes podem ser: extensivo, semi-intensivo, intensivo e superintensivo. Dentre os diferentes modelos de produção de pescado, destaca-se o regime intensivo, o qual apresenta uma produção mais controlada e sistematizada, visando a otimização da criação e o seu melhor retorno produtivo (SEBRAE, 2015). Porém, o sistema intensivo constitui-se em um ambiente favorável à disseminação de doenças devido à maior densidade

populacional dos animais, o que pode levar os animais à situação de estresse e lesões físicas, com o agravante de que, na aquicultura, o ambiente aquático propicia a proliferação de doenças infecciosas. Eventuais alterações físico-químicas no ambiente aquático, como queda acentuada da temperatura, por exemplo, além de práticas de manejo inadequadas, também afetam diretamente o estado de saúde dos peixes, deixando a população mais vulnerável aos surtos de doenças infecciosas (PAVANELLI *et al.*, 2002; ROTTA *et al.*, 2003).

Para reduzir o surgimento de doenças infecciosas na aquicultura e evitar a introdução de agentes patogênicos causadores de doenças, fazem-se importantes as boas práticas de manejo, o uso de técnicas apropriadas de criação ou cultivo e o constante monitoramento do ambiente. Quando ocorre o surgimento de doenças no ambiente aquático, medicamentos veterinários, tais como antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários são utilizados para evitar a perda total ou parcial dos animais (CARRASCHI *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2012; RICO *et al.*, 2014; ROTTA *et al.*, 2003). Estes medicamentos devem ser usados corretamente e de forma responsável para que não sejam prejudiciais à saúde pública, ao meio-ambiente e à saúde do animal, evitando também a possível perda de confiança por parte do consumidor, o qual está cada vez mais exigente sobre a qualidade do alimento que está consumindo (JSA, 2007).

1.2. Uso de medicamentos veterinários na aquicultura

Os antibacterianos e os antiparasitários são agentes antimicrobianos que matam ou inibem o crescimento de microrganismos. Esses compostos possuem comportamentos diversos, atuando como biocidas (promovendo a morte dos microrganismos responsáveis pelo processo infeccioso) e com ações biostáticas (inibem o crescimento microbiano) (JUNIOR, 2012).

Apesar da grande importância dos medicamentos veterinários para os diversos sistemas de produção animal, atualmente, no mercado mundial há poucas opções regulamentadas para uso na aquicultura. Esta baixa disponibilidade pode

levar ao uso inapropriado de produtos não devidamente regulamentados para espécies aquícolas, como o uso adaptado de produtos registrados para outras espécies animais ou, ainda, de produtos proibidos, como verde de malaquita, clorfenicol, entre outros. Esta prática pode levar à presença de resíduos químicos nos produtos destinados ao consumo humano, representando riscos tóxicos, alergênicos e carcinogênicos (FDA, 2011). Além disso, o uso excessivo dos antibióticos também pode ser fonte de resistência microbiana, ou seja, algumas bactérias conseguem se adaptar ao meio e sobreviver mesmo na presença de antibióticos. Seu amplo uso no cultivo de peixes foi associado com o desenvolvimento de resistência em *Aeromonas hydrophila* e *A. salmonicida* - causadoras de gastroenterites em humanos; *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri* - causadoras de infecções entéricas, meningites e abscessos hepáticos em humanos; *Vibrio anguillarum* e *V. salmonicida* - causadoras de Vibrioses em peixes; *Pasteurella piscida* e *Yersinia rucke* - causadoras de infecções em peixes (SERRANO, 2005; KUBITZA, 1997; GUGLIEMETTI *et al.*, 2009).

No Brasil, há poucos fármacos permitidos pela legislação para serem administrados a espécies aquícolas no combate às doenças infecciosas. Para uso na aquicultura, são regulamentados o florfenicol e a oxitetraciclina como agentes antimicrobianos, além de uma vacina empregada contra infecções causadas por *Streptococcus agalactiae*. Como antiparasitários, há um produto à base de triclorfon e uma formulação homeopática (SINDAN, 2016).

Alguns desses medicamentos veterinários são listados na Tabela 1.

Tabela 1. Medicamentos veterinários aprovados para uso na aquicultura brasileira.

Nome comercial	Princípio ativo	Espécie	Indicação
Aquaflor 50% Premix	Florfenicol	Tilápia e seus híbridos;	Tilápia: Septicemias hemorrágicas causadas por <i>Aeromonas</i> spp. Estreptococose ocasionada por <i>Streptococcus agalactiae</i> .
FF-50 50% Pó oral		truta arco-íris	Truta arco-íris: Doença da boca vermelha ocasionada por <i>Yersinia ruckeri</i>

(Continuação)

Nome comercial	Princípio ativo	Espécie	Indicação
Aquavac® strep (vacina)	Células bacterianas de <i>Streptococcus agalactiae</i>	Tilápia	Imunização ativa de tilápias para reduzir a mortalidade e a doença decorrente de estreptococose causada por <i>Streptococcus agalactiae</i>
TM-700	Oxitetraciclina	Bagre	Septicemia hemorrágica causada por <i>Aeromonas liquefaciens</i> . Doenças ocasionadas por pseudomonas
Fator endecto aquicultura	Complexo homeopático	Crustáceos, moluscos, rãs, camarões, jacaré e peixes	Controle de endo e ectoparasitos em organismos aquáticos
Fator infecções aquicultura	Complexo homeopático	Peixes	Controle de doenças infecto-contagiosas causadas por bactérias, vírus e fungos
Masoten	Triclorfone	Truta, carpa, enguia e outros	Combate alguns parasitas de água doce tais como <i>Argulus</i> sp., <i>Ergasilus</i> sp., <i>Lemna</i> sp., <i>Trichodina</i> , <i>Dactylogyrus</i> sp., <i>Gyrodactylus</i> sp. e diversos trematódeos

A limitada disponibilidade de alternativas de medicamentos regulamentados para a aquicultura aliada à evidente demanda pelas mesmas, especialmente em sistemas intensivos de criação, constitui um cenário favorável à prática irregular do emprego de fármacos não regulamentados para as espécies aquícolas ou, ainda, de substâncias de uso proibido (CAMPOS, 2005).

Como o uso irregular de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos pode representar risco à saúde humana, o monitoramento da presença de seus resíduos em produtos alimentícios oriundos dos sistemas de criação é muito importante e visa, principalmente, a proteção da saúde do consumidor.

1.2.1. Antibacterianos de uso animal

Os antibacterianos são substâncias que agem sobre bactérias inibindo o seu crescimento ou causando a sua destruição (SÁEZ-LLORENS, 2000).

Quanto à origem, os antibacterianos podem ser classificados como naturais (antibióticos), semi-sintéticos e os quimioterápicos (sintéticos) (TORTORA *et al.*, 2005).

1.2.1.1. Sulfonamidas

As sulfonamidas (SF) são fármacos sintéticos utilizados extensivamente para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas (PASTOR-NAVARRO *et al.*, 2007) e também na prática veterinária para promover o crescimento animal (SANTOS, 2009).

A inibição bacteriana provocada pelas SF ocorre pela intervenção na reação bioquímica de síntese do ácido fólico, essencial para a sobrevivência das bactérias. Essa intervenção ocorre devido à semelhança da estrutura química (características estéricas e eletrônicas) das SF com o ácido p-aminobenzóico (PABA). O PABA é um metabólito essencial para muitas bactérias, pois está envolvido na síntese do ácido fólico, um importante precursor na síntese de ácido nucléicos. O PABA reage ao entrar em contato com o sítio ativo da enzima diidropteroato sintase para a produção do ácido fólico, porém, em presença de SF, elas podem se ligar aos sítios ativos daquela enzima no lugar do PABA, produzindo análogos não funcionais do ácido fólico, o que impede o crescimento bacteriano. Devido a essa ação, as sulfonamidas são chamadas de antimetabólitos ou antagonistas metabólicos (NOGRADY; WEAVER, 2005; KOROLKOVAS *et al.*, 1982).

As SF têm sido largamente usadas na aquicultura, principalmente em casos de infecção por *Aeromonas sp*, *Pseudomonas sp* e *Vibrio sp*. Essas bactérias estão

geralmente envolvidas com doenças como úlceras e septicemia hemorrágica causando um grande número de mortalidade (SAMANIDOU, 2008).

A estrutura principal das SF é composta por um anel benzênico, com um grupo amino e um grupo sulfonamida. As variações entre os representantes das SF são dadas pela substituição do radical ligado ao grupo sulfonamida GOODMAN, 1996). Na figura 1, encontram-se as estruturas de algumas das moléculas de sulfonamidas, as quais foram objetos deste estudo.

Figura 1. Estrutura química das sulfonamidas

1.2.1.2. Quinolonas

As quinolonas (QN) são antibacterianos sintéticos, cujo espectro de atividade abrange bactérias gram-negativas, gram-positiva, anaeróbias e micobactérias. São compostos largamente empregados no tratamento de diversas infecções na medicina humana e veterinária, incluindo a aquicultura (BOTSOGLOU & FLETOURIS, 2001). Sua ação se dá através da inibição da topoisomerase II bacteriana (DNA-girase) e topoisomerase IV, enzimas essenciais para a replicação, transcrição, recombinação e reparação do DNA bacteriano (LESHER *et al*, 1962).

As quinolonas de primeira geração, tais como os ácidos oxolínico e nalidíxico, são os representantes mais antigos, sendo que até hoje são utilizados mundialmente na profilaxia de doenças bacterianas na piscicultura (SAMUELSEN, 2006). As quinolonas de segunda geração apresentam na sua estrutura um átomo de flúor na posição C-6, conferindo-lhes uma maior eficácia contra bactérias gram-negativas. A terceira geração das quinolonas atua em bactérias gram-positivas e microrganismos anaeróbios. O aumento do espectro de ação das quinolonas da terceira geração foi obtido através da introdução de um grupo metoxi na posição C-8 e um anel piperazínico na posição C-7 (ANDRIOLE, 1999; DRLICA, 1999; CAZZOLA *et al.*, 2001).

Na aquicultura as quinolonas são usadas para o tratamento de processos de septicemia generalizado causados por *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, *Renibacterium salmoninarum* e *Pasteurella piscicida*, apresentando-se superior a outros antimicrobianos como sulfadiazina-trimetoprima e oxitetraciclina (BOWSER & BABISH, 1991; SAMANIDOU *et al.*, 2008).

Na figura 2, encontram-se as estruturas de algumas moléculas de quinolonas, as quais foram objetos deste estudo.

Ciprofloxacina **Massa Molar: 331,3****pKa: 6,08 / 8,41****Difloxacina** **Massa Molar: 399,3****pKa: 5,80 / 8,25****Enrofloxacin** **Massa Molar: 359,3****pKa: 5,70 / 7,97****Figura 2. Estrutura química das quinolonas****1.2.1.3. Tetraciclinas**

As tetraciclinas (TCCs) constituem um grupo de antibacterianos majoritariamente de origem natural, como os produzidos por diversas espécies de *Streptomyces*, porém, alguns são de origem semissintética. Compõem uma classe de antibióticos que agem contra uma grande variedade de microrganismos, desde bactérias gram-positivas até gram-negativas (MICHAEL *et al.*, 2016). O mecanismo de ação das tetraciclinas é bem estabelecido e há um consenso de que tetraciclinas se ligam a um sítio na subunidade 30S do ribossomo bacteriano impedindo a ligação do aminoacil-t-RNA no sítio A do ribossomo, a adição de aminoácidos e,

consequentemente, impedindo a síntese protéica (SHLAES, 2006; PAULA, 1999).

Desde a descoberta do primeiro membro deste grupo, em 1948, a clortetraciclina e outros representantes estão comercialmente disponíveis, dentre os quais a oxitetraciclina é comumente empregadas na medicina veterinária em todo o mundo por apresentar vantagens quanto à eficácia e baixo custo de aquisição, em comparação com outros antimicrobianos (OKA & MATSUMOTO, 2000). Em peixes, a oxitetraciclina é utilizada no combate a furunculoses, úlceras e outras infecções causadas por bactérias gram-negativas (UENO *et al.*, 1999).

Na figura 3, encontram-se as estruturas de algumas das moléculas de tetraciclinas, as quais foram objetos deste estudo.

Figura 3. Estrutura química das tetraciclinas

1.2.2. Antiparasitário de uso animal

Especial atenção deve ser dada às doenças parasitárias, as quais consistem uma das maiores causas de perdas na piscicultura e servem como “porta de entrada” para agentes bacterianos e fúngicos, comprometendo o desempenho zootécnico e a reprodução dos peixes, além de disseminar agentes patogênicos para o ambiente, gerando prejuízos ao produtor e riscos à saúde pública (PUMB, 2001; LIMA et al., 2006).

Os antiparasitários constituem um grupo de medicamentos usado no tratamento de parasitoses causadas por nematódeos, céstodos e trematódeos, além de infecções causadas por protozoários e amebas (HENNESSY, 1994).

Até o momento, o único antiparasitário regulamentado no Brasil para uso na aquicultura é um antiparasitário alopático à base de triclorfon, um organofosforado indicado no combate de parasitas de peixes de água doce como *Argulus sp.*, *Ergasilus sp.*, *Lernea sp.*, *Trichodinas*, *Dactylogyrus sp.*, *Gyrodactylus sp.* e diversos trematódeos (JUAREZ & ROUSE, 1983). No entanto, a literatura científica aponta para alguns antiparasitários já empregados em outras espécies animais produtoras de alimentos como benzimidazóis e avermectinas indicado no combate de parasitas de bovinos, o que pode ser considerado, sob o ponto de vista de segurança alimentar, um indicativo de potencial para uso também em espécies aquícolas (KOROLKOVAS & FRANÇA, 2009; SPINOSA et al., 2011).

1.2.2.1 Benzimidazóis

Os benzimidazóis são compostos orgânicos heterocíclicos aromáticos que consistem na fusão do anel benzênico e do imidazol. Por serem fármacos de amplo espectro de ação, possuem baixo custo, apresentarem alta eficácia e facilidade de administração, são largamente empregados no tratamento de doenças parasitárias, especialmente de origem helmínticas (DAYAN, 2003; WU et al., 2005).

O albendazol (ABZ) pertence à classe dos benzimidazóis, constituindo-se em um anti-helmíntico polivalente que exerce atividade vermícida, ovícida e larvívica sobre os cestódeos, nematódeos e acantocéfalos. Age por contato direto com os vermes, inibindo a formação de seus microtúbulos através do bloqueio da captação da glicose, o que resulta na depleção de glicogênio dos parasitas e, por sua vez, na formação reduzida de trifosfato de adenosina necessário para a sobrevivência e reprodução destes. Consequentemente, ocorrem paralisia e morte dos vermes, os quais são, então, eliminados do organismo (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2009; SPINOSA *et al.*, 2011).

Atualmente, o ABZ é listado no Código de Regulamentos Federal (*Code of Federal Regulations* – CFR), sendo aprovado e regulamentado para uso em bovinos, ovinos e caprinos. Devido à alta eficácia e baixa toxicidade, o ABZ tem sido utilizado para tratar diversos parasitas que acometem os peixes, tais como microsporídeos (SCHMAHAL; BENINI, 1998; SPEARE *et al.*, 1999), infestações por tênia *Eubothrium crassum* (YU *et al.*, 2011) e infecções ocasionadas pelo flagelado *Hexamita salmonis* (TOJO; SANTAMARINA, 1998).

Na figura 4, encontra-se a estrutura molecular do albendazol, objeto deste estudo.

Figura 4. Estrutura química do albendazol

1.3. Legislação vigente sobre o uso de medicamentos na piscicultura

Devido ao crescente uso de medicamentos nas últimas décadas em alimentos de origem animal, os órgãos de fiscalização estão aumentando o rigor com relação à essa questão, tanto pela proibição de certas substâncias, como também estabelecendo o Limite Máximo de Resíduos (LMR).

O LMR é definido como a concentração máxima de resíduo tolerável no alimento resultante do seu uso. É baseado no tipo e quantidade de resíduo que não induz efeito adverso à saúde humana considerando a Ingestão Diária Aceitável (IDA) do composto. A IDA é definida como a quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem que provoque danos à saúde, sendo determinada com base nas informações toxicológicas disponíveis daquele composto na época da avaliação (JECFA, 2007).

O LMR em alimentos é estabelecido pelo Codex Alimentarius (do latim, Código Alimentar), o qual é assessorado pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde, ou pelos órgãos competentes de cada país, como é o caso, no Brasil, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Ministério da Saúde. As ações desses órgãos têm como objetivo reduzir a probabilidade de introdução de um perigo que possa afetar a segurança alimentar, visando a proteção do consumidor.

No Brasil, há dois programas que monitoram a presença de resíduos de medicamentos nos produtos de origem animal. Tratam-se do Programa Nacional de Controle de Análise de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal), desenvolvido pelo MAPA e o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet), desenvolvido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, do MS) com o objetivo de operacionalizar sua competência legal de controlar e fiscalizar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos.

Os fármacos alvos do presente trabalho compõem algumas das classes de antimicrobianos previstas no PNCRC/Animal, de modo que o método analítico desenvolvido visa propor nova alternativa aos métodos já empregados no programa.

A Tabela 2 lista os fármacos e os valores de LMR estabelecidos para os fármacos de interesse no presente trabalho na matriz de diferentes espécies animais.

Tabela 2. Valores de LMR estabelecidos pelo MAPA

Organização	Fármacos	Espécie	LMR (ng g ⁻¹)
PNCRC	Albendazol	Bovino/Suíno	100
PNCRC	Tetraciclina	Pescados	200
PNCRC	Oxitetraciclina	Pescados	200
PNCRC	Clortetraciclina	Pescados	200
PNCRC	Enrofloxacin	Pescados	100
PNCRC	Ciprofloxacina	Pescados	100
PNCRC	Difloxacina	Pescados	300
PNCRC	Sulfametazina	Pescados	100
PNCRC	Sulfatiazol	Pescados	100
PNCRC	Sulfadimetoxina	Pescados	100

1.4. Metodologia analítica para determinação de resíduos de medicamentos utilizados na piscicultura

Os órgãos governamentais nacionais e internacionais responsáveis pela questão de segurança alimentar, têm dedicado especial atenção ao controle e monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários devido aos riscos à saúde, com ênfase no surgimento e desenvolvimento de resistência bacteriana. Diante disso, o monitoramento desses resíduos nos alimentos torna-se imprescindível na questão de segurança alimentar, fazendo-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis que possibilitem a determinação

de baixos níveis de resíduos de medicamentos de diferentes classes, objetivando a diminuição de custos, bem como a diminuição do tempo de análise, além de sua fácil adaptação para a detecção de diferentes compostos na matriz desejada, conforme a necessidade (MENDONÇA, 2012; PASCHOAL, 2007),

Os resíduos de antimicrobianos podem ser monitorados através do emprego de diversas técnicas analíticas, como a cromatografia líquida ou gasosa, associada a diferentes sistemas de detecção.

Devido ao fato dos alimentos constituírem-se em matrizes complexas, atenção especial deve ser dada ao preparo da amostra que antecede a análise instrumental. Esse preparo envolve um processo de extração dos analitos alvos a partir da amostra, e a subsequente purificação do extrato a fim de isolar os analitos de interesse a partir da remoção de interferentes remanescentes da matriz que poderiam afetar o desempenho da técnica analítica empregada (KLIMEK-TUREK *et al.*, 2016; KINSELLA *et al.*, 2009).

Abordagens clássicas sobre o preparo de amostra e/ou extração de resíduos e contaminantes nos alimentos apresentam diferentes métodos e técnicas tais como Extração com Fluido Supercrítico (SFE), Extração Líquido-Líquido (LLE), Extração Líquida Pressurizada (PLE), Extração Assistida por Microondas (MAE), Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD), Extração em Fase Sólida (SPE), Microextração em Fase Sólida (SPME), Extração Sortiva em Barras de Agitação (SBSE) e QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap Effective, Rugged, Safe*), cuja tradução livre no português seria Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro (BULDINI; RICCI; SHARMA, 2002; ZHANG *et al.*, 2012; LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007). A Tabela 3 apresenta alguns trabalhos descritos na literatura que reportam métodos analíticos voltados à quantificação de fármacos em filé de peixe.

Principalmente devido à característica de grande versatilidade, o método de QuEChERS têm sido amplamente empregado para a extração de diferentes grupos de compostos em diferentes matrizes (ambientais, alimentares e biológicas) e será melhor discutido a seguir (CHOI *et al.*, 2015; DMITRIENKO *et al.*, 2014).

Tabela 3. Trabalhos descritos na literatura para determinação de fármacos em peixe

Analitos	Matriz	Extração	Fase Móvel	Fase Estacionária	Instrumentação	Ref.
Benzimidazóis quinolonas, sulfonamidas e tetraciclinas	Dourada	QuEChERS	0,1% de ácido fórmico em água e 0,1% de ácido fórmico em ACN	C ₁₈ (100 mm × 2,1 mm, 1,7 µm)	UHPLC–MS/MS	Lopes <i>et al.</i> , (2012)
Quinolonas, tetraciclinas e sulfonamidas	Tilápia, truta e tambaqui	LLE	0.1% de ácido heptafluorobutírico em água e ACN	C ₁₈ (150×4.6 mm, 1.8 µm)	LC–MS/MS	Guidi <i>et al.</i> , (2017)
Sulfonamidas	Tilápia	QuEChERS	Acetato de amônio 5 mM e ácido fórmico com pH de 3,5; B: MeOH	C ₁₈ (4.6 X 150 mm, 5µm)	LC–MS/MS	Kung <i>et al.</i> , (2015)
Tetraciclinas	Tilápia	LLE, SPE, dSPE e QuEChERS	Solução aquosa contendo acetato de sódio, cloreto de cálcio Cloreto e EDTA a pH 7,00 e ACN: MeOH	C ₁₈ (250mm× 4.6mm, 5µm)	LC-FL	Orlando <i>et. al.</i> , (2013)
Quinolonas e tetracilcinas.	Peixe-gato	LLE	Tampão LC (malonato de 0,1 M, cloreto de magnésio 50 mM, pH 6,5 com NH ₄ OH e MeOH	XDB-fenil (3,0 mm x 150 mm, 3,5 µm)	LC-FL	Schneid eret <i>al.</i> , (2007)
Sulfonamidas.	Salmão	LLE	0.1% ácido acético em água e 0.1 % ácido acético em ACN	C ₁₈ (15cmx2 mm, 3,5 µm)	LC–MS/MS	Ross <i>et al.</i> , (2007)
Tetraciclinas e sulfonamidas	Ovos, peixes e camarão	PLE	Solução com 0,01 M de ácido oxálico e ACN:MeOH	C ₁₈ (150mm× 4.6 mm 5 µm)	LC-UV	Liu <i>et al.</i> , 2013)
Tetraciclinas	Maruca	LLE	0,1% de ácido fórmico em água e ACN	C ₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.8 µm)	UHPLC–MS/MS	Dasenaki <i>et al.</i> , (2010)
Quinolinas e sulfonamidas.	Tilápia	LLE	0,1% de ácido fórmico em água e 0,1% de ácido fórmico em MeOH	C ₁₈ (50 mm x 3 mm, 2,7µm)	LC–MS/MS	Rezk, <i>et al.</i> , (2015)
Quinolonas	Peixe, suíno e frango	LLE	NaH ₂ PO ₄ (pH DAD 2,5) e ACN	C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm)	LC-UV	SU <i>et al.</i> , (2003)
Quinolonas	Salmão	LLE	A: 0,1% de ácido fórmico em água e ACN	C ₁₈ (250 x 3 mm, 5 µm)	LC–MS/MS	HERNANDO <i>et al.</i> , (2006)
Quinolona e fluorquinolona	Salmão	SPE	metanol-acetonitrilo-tampão de citrato 10 mM a pH 4,5,	C ₁₈ (150 mm × 4,6 mm, 5 µm.	LC- UV	Cañada-Cañada (2012)

(Continuação)

Analitos	Matriz	Extração	Fase Móvel	Fase Estacionária	Instrumentação	Ref.
Sulfonamidas	Salmão	LLE	0,1% de ácido fórmico em água e 0,1% de ácido fórmico ACN	C ₁₈ (15 cm x 2 mm, 3 µm)	LC-MS/MS	Potter <i>et al.</i> , (2007)
Organoclorados organofosforado	Carpa	QuEChERS	Hélio	HP-5 ms 30 m x 250 µm x 0.25 µm	GC-MS	Molina-Ruiz <i>et al.</i> , (2015)
Quinolonas e sulfonamidas	Tilápia, anguilla e peixe-gato	LLE	5 mM acetate de amônio e 0.05% de ácido fórmico em água e MeOH	C ₁₈ column (4.6 x 150 mm, 5 µm)	LC-MS/MS	CHUNG-WEI (2012)
Tetraciclinas	Espécie indefinida	SPME	Ác. Oxálico, MeOH e ACN	C ₁₈ (100 x 4,6 mm)	LC-DAD	WEN <i>et al.</i> , (2006)
Benzimidazol	Pacu	QuEChERS	0,1% de ácido fórmico em água e ACN	C ₁₈ (3.9 mm x 100 mm x 3.5 µm)	LC-MS/MS	Busatto <i>et al.</i> , (2017)

Onde: LSE: extração sólido-líquido; LLE: extração líquido-líquido; SPE: extração em fase sólida; dSPE: extração de fase sólida dispersiva; PLE: extração por líquido pressurizado; ENR: enrofloxacin; DAN: danofloxacin; CIP: ciprofloxacina; OXT: oxitetraciclina; CTC: clortetraciclina; TTC: tetraciclina; SDM: sulfadimetoxina; SMT: sulfametazina; STZ: sulfatiazol; ABZ: albendazol; ACN: acetonitrila; MeOH: metanol; FL: fluorescência; UV: ultravioleta; MS: espectrometria de massas; UHPLC: cromatografia líquida de ultraeficiência; HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência.

1.4.1 QuEChERS

Em 2003, Anastassiades e colaboradores, com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos multirresíduo de extração disponíveis na época, introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos de praguicidas denominado QuEChERS. Durante o seu desenvolvimento, grande ênfase foi dada para a obtenção de um procedimento dinâmico, que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório a partir de uma simplificação das etapas.

Anastassiades e colaboradores revisaram as condições comumente utilizadas na análise multirresíduo de praguicidas e propuseram este novo método de preparo de amostra, baseado nas seguintes etapas: extração com acetonitrila (ACN), seguida de partição, auxiliada pela adição de sais (ex. sulfato de magnésio, (MgSO₄) e cloreto de sódio (NaCl). Um novo método de limpeza denominado

Extração em Fase Sólida Dispersiva (*dispersive Solid Phase Extraction*, dSPE) foi proposto juntamente com o método QuEChERS.

A acetonitrila proporciona a extração de uma ampla faixa de praguicidas com diferentes polaridades, permitindo eficiências de extração (recuperações dos analitos ao final do processo) satisfatórias. Porém outros solventes são frequentemente utilizados, tais como acetona, metanol (MeOH), etanol e acetato de etila (REJCZAK; TUZIMSKI, 2015).

A adição de sais para promover o efeito “*salting out*” é utilizada em vários métodos multirresíduos. Dependendo da natureza do solvente utilizado na etapa de partição, obtém-se melhores percentuais de eficiência de extração para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica (HAGE, 1996; PIZZUTTI, 2007).

A escolha do MgSO_4 no desenvolvimento do método QuEChERS foi devido a maior capacidade de remover água da matriz (amostra) quando comparado a outros sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente, dos compostos apolares (ANASTASSÍADES *et al.*, 2003).

A etapa de limpeza (*clean up*) é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que eventuais interferentes remanescentes da matriz podem ficar aderidos no sistema de injeção e também na coluna cromatográfica, alterando a resposta do sistema e aumentando a frequência de demanda por manutenções técnicas no equipamento (SAITO *et al.*, 2004; UENO *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, a etapa de limpeza emprega SPE, a qual utiliza cartuchos ou colunas que contêm entre 250 e 1000 mg de sorvente. Esta técnica, geralmente envolve operação manual, uso de diferentes solventes nas etapas de condicionamento do sorvente, lavagem e eluição do analito. Muitos fatores afetam a precisão quando se trabalha com SPE, entre eles, a disposição física do sorvente no cartucho ou coluna (variação no leito de passagem da amostra), o ajuste do sistema

de vácuo e a vazão dos solventes. Esta técnica, quando automatizada, apresentam custo considerável, podendo encarecer sobremaneira as análises (Hyötyläinen, 2008).

Ao contrário dos métodos já existentes para limpeza com SPE que utilizam cartuchos ou colunas, a dSPE permite que essa etapa, bem como a redução de água residual da amostra, sejam efetuadas de uma forma rápida e simultânea. Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando assim a precipitação de interferentes polares. O sorvente PSA (amina primária e secundária) retém os interferentes da matriz, sendo que depois da agitação manual e centrifugação, o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (ANASTASSÍADES *et al.*, 2003). O PSA tem um elevado efeito quelante devido à presença dos grupos amino (amina primária e secundária). Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte. Uma limpeza eficiente garante uma maior vida útil para injetores e colunas cromatográficas, reduzindo assim a contaminação do sistema cromatográfico e minimizando o efeito matriz (BEYER *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2005).

Outra modificação bastante relevante foi a adição de C₁₈ (LEHOTAY *et al.*, 2005a) como alternativa ou de forma conjunta ao PSA na etapa de limpeza (dSPE) para promover uma limpeza mais efetiva em algumas matrizes, em especial aquelas que contêm gordura (CUNHA *et al.*, 2007; LEHOTAY, 2010). Novos sorventes vêm sendo desenvolvidos, como a quitosana, por exemplo, que se trata de um polissacarídeo catiônico produzido através da desacetilação da quitina, um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de crustáceos, através de um processo de alcalinização sob altas temperaturas. Quitina e quitosana são biopolímeros renováveis, de baixo custo de aquisição e suscetíveis a modificações químicas para aumentar sua capacidade de adsorção (CABRERA, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho consistiu em desenvolver e avaliar o desempenho de um método analítico empregando cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), empregando um método de extração baseado no princípio do QuEChERS para a determinação simultânea de resíduos de antimicrobianos (antibacterianos e antiparasitários) em filé de peixes. Depois de estabelecido o método analítico, o mesmo foi empregado na análise de algumas amostras de filé de peixe, disponíveis no comércio da cidade de Ribeirão Preto, SP.

2.2 Etapas

- i) Otimizar as condições de monitoramento dos analitos selecionados por ESI-MS/MS;
- ii) Estabelecimento das melhores condições de separação cromatográfica para uma análise eficiente e compatível com o sistema de detecção por MS/MS;
- iii) Estudo e desenvolvimento de um método de extração dos analitos a partir de filé de peixes baseado no princípio do método QuEChERS;
- iv) Avaliação do desempenho do método analítico desenvolvido, tomando como referência, os parâmetros de avaliação analítica recomendados pelo MAPA para esse tipo de método: Manual de Garantia da Qualidade Analítica – Resíduos e Contaminantes em alimentos (MAPA 2011);
- v) Aplicar o método estabelecido na análise de amostras disponíveis comercialmente em peixarias da cidade de Ribeirão Preto, SP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

A pesagem dos padrões dos fármacos utilizados na preparação da solução estoque foi realizada em balança Shimadzu AUW220D (SHIMADZU, Japão), enquanto que para a pesagem do filé de peixe utilizou-se balança analítica Marte AL 200C (MARTE BALANÇAS E APARELHOS DE PRECISÃO LTDA, Brasil).

Nas diferentes etapas que compõem o método de extração, foram empregados os equipamentos: Mesa Agitadora PA 247 (Pachane, Brasil), agitador de soluções Vortex AP56 (Phoenix, Brasil), centrífuga Himac CF 5RX (Hitachi Koki Co. Ltd., Japão).

Foi utilizado sistema de filtração de água ultrapura (Direct-Q 3, Merck Millipore, Alemanha) para a obtenção de água deionizada, a qual foi empregada no preparo de todas as soluções aquosas utilizadas no método analítico.

A fase móvel empregada no sistema LC-MS/MS foi sonicada em aparelho de ultra-som Maxi Clean 1450 (Unique, Brasil).

O sistema LC-MS/MS empregado é composto por um HPLC (Shimadzu, Japão) de sistema de bombeamento duplo, acoplado a um espectrômetro de massas (Quattro LC, Micromass, Manchester, KU) através de uma interface de eletronebulização (ESI), composto por analisadores de massas do tipo triplo-quadrupolo. A aquisição de dados foi realizada mediante o programa computacional MassLynx (Waters, EUA).

3.2 Reagentes e acessórios

Utilizou-se acetonitrila grau HPLC (JTBaker, Mexico), metanol grau HPLC (JTBaker, Mexico) e ácido fórmico (Merck, EUA). Foram utilizados os seguintes padrões dos fármacos em estudo: albendazol ($\geq 98\%$, Fluka Analytical – Sigma-

Aldrich, China), sulfadimetoxina ($\geq 98,5\%$, Fluka Analytical – Sigma-Aldrich, China), sulfatiazol ($\geq 98\%$, Fluka Analytical – Sigma-Aldrich, China), sulfametazina ($\geq 99\%$, Fluka Analytical – Sigma-Aldrich, China), fenacetina ($\geq 98\%$, Aldrich Chemistry – Sigma-Aldrich, China), difloxacinina ($\geq 98\%$, Fluka Analytical – Sigma-Aldrich, China), ciprofloxacina ($\geq 98\%$, Fluka Analytical – Sigma-Aldrich, China), enrofloxacinina ($\geq 98\%$, Fluka Analytical – Sigma-Aldrich, China), clortetraciclina ($\geq 75\%$, Fluka Analytical – Sigma-Aldrich, China), tetraciclina ($\geq 98\%$, Fluka Analytical – Sigma-Aldrich, China) e oxitetraciclina ($\geq 95\%$, Fluka Analytical – Sigma-Aldrich, China) foram preparadas em MeOH, na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

O cloreto de sódio e o acetato de sódio (CH_3COONa) foi obtido da Vetec química fina (Rio de Janeiro, Brasil). O sulfato de magnésio anidro foi obtido junto a Sigma - Aldrich (São Paulo, Brasil), o PSA e o C_{18} utilizado foi da marca Agilent Technologies (EUA) e a quitosana foi obtido junto a Sigma - Aldrich (São Paulo, Brasil).

Antes da injeção cromatográfica, filtraram-se os extratos das amostras com membrana regenerada de celulose (Sartorius stedim biotech, Alemanha) com $0,20 \mu\text{m}$ de tamanho de poro e com 25 mm de diâmetro.

3.3 Soluções padrão

As soluções estoques de Albendazol (ABZ), clortetraciclina (CTC), tetraciclina (TTC), oxitetraciclina (OTC), enrofloxacinina (ENR), difloxacinina (DIFLO), ciprofloxacina (CIPRO), sulfametazina (SMZ), sulfatiazol (STZ) e fenacetina (FNC) foram preparadas em MeOH, na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Aos 25 mg de ABZ, CTC, TTC, OTC, ENR, DIFLO e CIPRO foram adicionados 1 mL de ácido fórmico para a completa solubilização e os volumes foram completados para 25 mL com MeOH. As soluções estoques foram armazenadas em frascos âmbar, mantidas em freezer à -20°C , e foram utilizadas por um período de até três meses.

3.4 Soluções de trabalho

As soluções de trabalho utilizadas no desenvolvimento dos métodos analíticos para determinação dos medicamentos no filé de peixe foram preparadas diariamente na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e abaixo desta mediante diluições apropriadas da solução estoque com uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%.

3.5 Amostras branco de filé de peixe

Para todo o desenvolvimento do método, foram utilizadas amostras branco de filé de peixe da espécie tilápia e pacu provenientes do Setor de Piscicultura do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, na cidade de Piracicaba-SP, em condições de garantia de que o manejo de criação não fez uso de qualquer medicação. Os filés foram previamente triturados com o auxílio de um processador de alimentos, separadas em embalagens de 5 g e armazenadas em freezer (-20°C).

3.6 Extração dos fármacos utilizando o método QuEChERS

Inicialmente, o método de extração foi desenvolvido para a matriz filé de tilápia. Posteriormente, o filé de pacu foi incluído no escopo do método analítico.

Para o procedimento de extração foi tomado como base o método QuEChERS. Para a avaliação das condições estudadas no procedimento de extração do filé de peixe, foram analisadas as eficiências de extração. Para tanto, fez-se a fortificação da matriz branco de filé com os analitos e com o padrão interno na concentração equivalente ao LMR de cada fármaco. Com o intuito de aumentar a interação dos analitos com a matriz, a amostra foi deixada em repouso por 15 minutos no escuro antes de iniciar o procedimento de extração. As concentrações dessas amostras foram calculadas através de curvas analíticas obtidas com os analitos em solução. Todos os testes foram realizados em triplicatas, sendo os resultados expressos como porcentagem do valor esperado.

Para o teste inicial, adicionou-se 5 mL de ACN a 5 g de filé, sendo a mistura levada à agitação em vortex durante 1 minuto. Em seguida, adicionaram-se 2 g de MgSO_4 anidro e 0,5 g de NaCl. Imediatamente após a adição dos sais, a mistura foi levada à agitação em vortex durante 1 minuto. A amostra foi centrifugada a 4 °C e 4000 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 3,0 mL do sobrenadante foi coletada e transferida para um tubo falcon contendo 450 mg de MgSO_4 e 75 mg de PSA. O sistema foi agitado em vortex por 1 minuto e, posteriormente centrifugado a 4 °C e 4000 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante foi coletada e filtrada com o auxílio de filtro de membrana de celulose regenerada, com porosidade de 0,20 μm de diâmetro e, posteriormente transferido para um vial. Um volume de 5 μL foi injetado no sistema LC-MS/MS. Um esquema do procedimento de extração descrito é representado na Figura 5.

Figura 5. Representação esquemática do processo de preparo de amostra

A partir dos testes iniciais, visou-se avaliar a escolha e o volume do solvente de extração, adição de diferentes sais e a adição de diferentes sorventes utilizados para a etapa de limpeza. O objetivo foi estabelecer as melhores condições para extração simultânea da maior variedade possível dos fármacos de interesse.

3.7 Condições LC-MS/MS

Para a separação cromatográfica, foi empregada fase móvel composta por solução aquosa 0,5% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila contendo 0,5% de ácido fórmico (solvente B), sob eluição em gradiente, vazão de 0,3 mL min⁻¹, temperatura mantida em 25 °C. O volume de injeção empregado foi de 5 µl. Como fase estacionária, empregou-se a coluna XTerra C₁₈ MS de dimensões 100 x 3,9 mm, 3.5 µm (Waters, EUA).

O sistema de ionização por eletronebulização foi operado em modo positivo (ESI+), com os analisadores de massas operando no modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM – Multiple Reaction Monitoring). As temperaturas da fonte de ionização e do gás de dessolvatação foram, respectivamente, de 100 °C e 450 °C. Nitrogênio foi empregado como gás de dessolvatação e de nebulização, operando sob vazão de aproximadamente 397 e 42 L hr⁻¹, respectivamente, enquanto argônio foi empregado como gás de colisão.

3.8 Avaliação do desempenho analítico do método desenvolvido

De acordo com o MAPA (2011), a validação de determinado procedimento analítico visa demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação preconizados. Trata-se de um estudo experimental e integralmente documentado. De modo geral, a validação visa garantir a qualidade dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões.

Após a seleção das melhores condições em cada etapa do método de extração e definição das condições cromatográficas, procedeu-se a avaliação do desempenho analítico do método. Para tanto, tomou-se como referência as recomendações do Manual de Garantia da Qualidade Analítica para Resíduos e Contaminantes em Alimentos, elaborado pela Coordenação Geral de Apoio Laboratorial da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011). Considerando que o presente trabalho visou apenas avaliar o potencial do método proposto, ou seja, sem intenção de credenciar o laboratório junto ao MAPA para o monitoramento das substâncias alvos, o número de replicatas empregado nas avaliações dos parâmetros foi reduzido em relação às recomendações do referido guia.

3.8.1 Seletividade e efeito matriz

A seletividade é a extensão na qual um procedimento analítico pode determinar analitos particulares em misturas ou matrizes sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante. Portanto, é a capacidade do procedimento analítico de discriminar entre a substância a analisar e substâncias análogas. Efeito matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferentes causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental (MAPA, 2011).

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas obtidos a partir da amostra branco e da amostra branco fortificada com os fármacos e o padrão interno, verificando a presença de interferentes da matriz que pudessem estar coeluído com os analitos. Realizou-se a avaliação do efeito de matriz por comparação da resposta do detector (áreas medidas) das soluções padrão dos fármacos em solvente, com aquelas preparadas com o extrato branco do filé de peixe em três níveis de concentração, compreendendo 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o LMR de cada analito em estudo. As concentrações obtidas foram então convertidas em porcentagens das concentrações esperadas para cada um dos fármacos. O teste foi realizado em triplicata.

3.8.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Tendo em vista que o objetivo principal das análises realizadas para o PNCRC é avaliar se as amostras estão ou não violadas, a curva de calibração deve ser construída de forma que os limites máximos permitidos para cada fármaco se encontre preferencialmente próximo da região central das suas respectivas curvas de calibração (MAPA, 2011).

Para a construção da curva analítica, foram realizados testes em quintuplicata, utilizando 5 níveis de concentrações, compreendendo 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 1,5 vezes o LMR de cada analito em estudo, fazendo com que o LMR se encontrasse na região central da curva, conforme apresentado na tabela 4. Para isso, o filé triturado (5 g) foi enriquecida com solução padrão na concentração desejada e em seguida, essas amostras foram submetidas ao processo de extração.

Tabela 4. Concentrações dos fármacos utilizadas em cada nível de suas respectivas curvas de calibração analítica

Analito	Concentrações (ng g ⁻¹)				
	Nível 1	Nível 2	*Nível 3	Nível 4	Nível 5
Albendazol	50	75	100	125	150
Clortetraciclina	100	150	200	250	300
Oxitetraciclina	100	150	200	250	300
Tetraciclina	100	150	200	250	300
Enrofloxacina	50	75	100	125	150
Ciprofloxacina	50	75	100	125	150
Difloxacina	150	225	300	375	450
Sulfametazina	50	75	100	125	150
Sulfatiazol	50	75	100	125	150
Sulfadimetoxina	50	75	100	125	150

(*)Nível de concentração da curva analítica correspondente ao LMR de cada fármaco em filé de peixe

A falta de ajuste (*Lack-of-Fit*) foi também determinada para avaliar se existe algum valor anormal nos resíduos e verificar o ajuste do modelo. Para tanto, foi utilizado o programa Statistica 6.0. O valor de p deve ser maior que 0,05 para se afirmar, com 95% de confiança, que não há falta de ajuste no modelo e, portanto, o mesmo pode ser utilizado (RAMSEY, SCHAFER, 1997).

3.8.3 Precisão

Precisão é uma estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As três maneiras de expressá-la são por meio de repetitividade, da precisão intermediária (ou reprodutibilidade interna ou reprodutibilidade intralaboratorial) e da reprodutibilidade interlaboratorial. Sendo que a reprodutibilidade interlaboratorial de um procedimento analítico somente pode ser estimada mediante a participação de um ensaio interlaboratorial colaborativo, raramente disponível. Dessa forma, o presente trabalho expressou a precisão analítica através da repetitividade e da precisão intermediária. A repetitividade corresponde ao grau de concordância dos resultados de medições sucessivas, entre uma corrida e outra, chamada também por precisão intracorrída. Já a precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sob as mesmas condições, mas alterando alguma condição, tais como: mudar o dia de análise, o analista ou o equipamento (MAPA, 2011)

Assim, a repetitividade foi realizada em três níveis de concentrações, compreendendo 0,5; 1,0; 1,5 vezes o LMR de cada analito em estudo fortificado na matriz branca, realizado em quintuplicata (n=5) e expressa através do coeficiente de variação (CV, %), que é calculado conforme a equação 1:

$$\text{Equação 1: } CV(\%) = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100$$

A precisão intermediária também foi avaliada a partir de amostras branco fortificadas com os analitos nos mesmos três níveis de concentração empregados na repetitividade, preparadas em dias diferentes (n=5).

Expressando a precisão em termos de coeficiente de variação (CV), o MAPA (2011) recomenda que os resultados obtidos para a precisão não excedamos valores descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Critérios para aceitação da precisão

Concentração	Coeficiente de variação (CV, %)	
	Repetitividade	Precisão intermediária
$10 \text{ ng g}^{-1} \leq c < 100 \text{ ng g}^{-1}$	13,3	20,0
$100 \text{ ng g}^{-1} \leq c < 1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$	10,0	15,0

3.8.4 Veracidade/Recuperação

A veracidade é a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro. A veracidade está inversamente relacionada ao erro sistemático ou a correção ou ao fator de correção. Sendo assim, a determinação da veracidade é feita por intermédio de ensaios de recuperação (MAPA, 2011).

Foram preparadas amostras fortificadas em três níveis de concentração, compreendendo 0,5; 1,0; 1,5 vezes o LMR de cada analito em estudo, em cinco réplicas. As respostas foram avaliadas através do fator de recuperação (f_{rec}), onde C_f é a concentração obtida após a fortificação da matriz branca, C_{nf} é a concentração obtida da matriz não fortificada e C_{ad} é a concentração do analito puro adicionado a matriz, de acordo com a equação 2:

$$\text{Equação 2: } f_{\text{rec}} (\%) = \frac{C_f - C_{\text{nf}}}{C_{\text{ad}}} \times 100$$

O MAPA estabelece a faixa de recuperação aceita de acordo com as concentrações dos analitos (TABELA 6).

Tabela 6. Faixa de recuperação (%) aceita pelo MAPA

Faixa de concentração (C)	Intervalos (f_{rec} , %)
$C \leq 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	-50% a +20%
$1 \mu\text{g kg}^{-1} < C \leq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	-30% a +10%
$C \geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	-20% a +10%

3.8.5 Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)

São parâmetros definidos na Decisão 2002/657/CE da Comunidade Europeia, os quais medem o desempenho do procedimento analítico levando em consideração a incerteza da medição no nível de concentração no qual se toma alguma decisão, o chamado nível de interesse (EC, 2002). No caso do presente trabalho, o nível de concentração de interesse para cada analito é o seu respectivo LMR.

O limite de decisão ($CC\alpha$), ou concentração crítica com erro α , e a capacidade de detecção ($CC\beta$), ou concentração crítica com erro β , são dois parâmetros estatísticos importantes e característicos do desempenho dos métodos analíticos para a pesquisa de resíduos de medicamentos em alimentos. Estas concentrações críticas definem a capacidade de um método detectar e quantificar a presença dos compostos pesquisados tendo em conta a variabilidade do método e os erros estatísticos associados a resultados incorretos (EC, 2002).

O $CC\alpha$ é a concentração a partir da qual uma amostra pode ser declarada não conforme com uma probabilidade de erro igual a α (erro de 1% para substâncias não permitidas e de 5% para substâncias com LMR). No caso das substâncias com LMR, o $CC\alpha$ é a concentração a partir da qual, com uma certeza de 95% ($1-\alpha$), a substância está presente em concentração superior ao seu LMR. O $CC\beta$ de um método é o limite a partir do qual o analito pode ser detectado, identificado e/ou quantificado com uma probabilidade de erro β (EC, 2002).

O limite de decisão do método foi estimado pela soma da concentração correspondente ao LMR mais 1,64 vezes o desvio padrão obtido no ensaio de precisão intermediária e a capacidade de detecção do método foi obtida pela soma da concentração correspondente ao LMR mais 3,28 vezes o desvio padrão obtido no ensaio de precisão intermediária.

3.9 Ampliação do escopo analítico

Visando obter uma maior versalidade de aplicação do método, foi avaliada a possibilidade de extensão de escopo analítico, incluindo nova matriz, no caso, filé de pacu, o qual apresenta teor de gordura em sua constituição, cerca de duas vezes maior que o da tilápia (KUBITZA, 2000).

Para incluir nova matriz no escopo de um método analítico multirresíduo, os parâmetros de avaliação de desempenho analítico também devem ser considerados para a nova amostra. Para inclusão de nova matriz, o manual de validação do MAPA (2011) recomenda que os seguintes estudos devem ser reavaliados: Linearidade, Seletividade, veracidade/recuperação, precisão, limite de decisão e a capacidade de detecção. Sabendo que o teor de gordura da matriz biológica envolvida nos estudos é muito importante, principalmente na etapa de extração dos analitos e limpeza dos extratos, a possibilidade de aplicação de um mesmo método na análise de amostras de tilápia e pacu seria um importante indicador de versatibilidade do mesmo, principalmente em se tratando de um método multirresíduos.

3.10 Amostras analisadas

Após o desenvolvimento e validação, o método foi aplicado em amostras de filé de tilápia e pacu disponíveis comercialmente em peixarias de Ribeirão Preto, Sp. Essa pesquisa teve como objetivo verificar se as amostras comercializadas apresentavam resíduos de medicamentos veterinários. Foram adquiridas duas

amostras de filé de tilápia e de pacu de cinco peixarias, resultando em vinte amostras. Para cada amostra foi realizada três réplicas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando-se obter um método analítico abrangente, capaz de analisar amostras de pescado para a determinação simultânea de resíduos multiclassés (antibacterianos e antiparasitários), foram selecionados alguns dos fármacos previstos para monitoramento no PNCRC, tais quais: albendazol, ciprofloxacina, clortetraciclina, difloxacina, enrofloxacina, oxitetraciclina, sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfatiazol e tetraciclina.

4.1 Estabelecimento das condições LC-MS/MS

As condições de ionização e detecção dos fármacos pelo sistema ESI-MS/MS foram avaliadas e ajustadas a partir da infusão direta ($20 \mu\text{L min}^{-1}$) de solução (solução aquosa de ácido fórmico 0,1%: acetonitrila, 50:50, v/v) contendo os analitos diluídos em concentrações de aproximadamente $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, visando selecionar os parâmetros que conferissem maior detectabilidade dos compostos. A fonte de eletronebulização foi operada no modo positivo (ESI+). As temperaturas da fonte e do gás de dessolvatação selecionadas foram de 100 e 350 °C, respectivamente. O nitrogênio foi empregado como gás de nebulização e de secagem, operando nas vazões de cerca de 40 e 380 L h⁻¹, respectivamente. O argônio foi o gás empregado na célula de colisão. As voltagens empregadas na fonte ESI durante as análises foram 3 kV no capilar e 3 V no extrator. O diferencial de potencial do cone, a janela de detecção, a energia de colisão e os íons de transição selecionados para o Monitoramento das Reações Seleccionadas (*Selected Reaction Monitoring*, SRM) de cada um dos fármacos estudados estão descritos na tabela 7. No apêndice A encontra-se o espectro de massas dos fármacos com os íons produtos.

Tabela 7. Condições otimizadas de ionização e detecção dos fármacos pelo sistema ESI-MS/MS

Analito	Transição de quantificação (<i>m/z</i>)	Transição de confirmação (<i>m/z</i>)	Diferencial de potencial do cone (V)	Energia de colisão (eV)	Janela de Monitoramento (min)
Albendazol	266>234	266>191	30	25	8,6 - 12
Clortetraciclina	479>444	479>462	35	20	6 - 8,6
Ciprofloxacina	332>314	332>245	25	20	6 - 8,6
Difloxacina	400>382	400>356	30	20	6 - 8,6
Enrofloxacin	360>342	360>316	30	20	6 - 8,6
Oxitetraciclina	461>426	461>443	20	15	6 - 8,6
Sulfadimetoxina	311>156	311>92	30	25	8,6 - 12
Sulfametazina	279>186	279>92	25	20	6 - 8,6
Sulfatiazol	256>155	256>108	20	15	6 - 8,6
Tetraciclina	445>427	445>410	22	27	6 - 8,6

Depois de estabelecidas as condições de monitoramento dos fármacos pelo sistema (ESI+)–MS/MS, foi avaliado e ajustado o gradiente de eluição da fase móvel do sistema cromatográfico, composta por solução aquosa de ácido fórmico 0,5% e acetonitrila com ácido fórmico 0,5%, objetivando a obtenção de uma corrida cromatográfica mais eficiente possível, visando-se obter um perfil cromatográfico adequado e no menor tempo de corrida analítica possível. Para tanto, selecionou-se o gradiente que conferisse condições de monitoramento dos analitos visando o menor tempo de corrida possível, sem prejuízo significativo ao monitoramento dos analitos de forma simultânea. Dessa forma, estabeleceu-se janelas de

monitoramento dos fármacos em subgrupos, conforme a ordem de eluição obtida. O gradiente utilizado no sistema LC-MS/MS é mostrado na tabela 8.

Tabela 8. Composição da fase móvel em eluição por gradiente

Tempo	Fase móvel aquosa	Fase móvel orgânica
(min)	(A, %)	(B, %)
0	90	10
1	60	40
4	60	40
5	20	80
8.5	20	80
9.5	90	10
14	90	10

Um cromatograma característico para o monitoramento dos fármacos em estudo nas condições estabelecidas, a partir de uma amostra branco de filé fortificada, é apresentado na Figura 6.

Embora a FNC seja estruturalmente diferente das outras substâncias, ela foi selecionada como padrão interno devido aos resultados satisfatórios obtidos na avaliação. Ademais, a FNC apresenta tempo de retenção próximo às outras substâncias e não é utilizada na medicina veterinária.

Figura 6. Cromatograma característico da amostra branco fortificada com os fármacos na concentração de 0,5 vezes o LMR (Tabela 4) e PI (FNC) na concentração de 100 ng g^{-1} após procedimento de extração

4.2 Estabelecimento das condições de extração

As etapas do processo de extração foram definidas em função de testes univariados, avaliando-se as eficiências de extração dos analitos e se o procedimento era eficaz para a remoção de interferentes da matriz.

Os testes foram sempre realizados em triplicata, tomando como resposta os valores de eficiência de extração.

4.2.1 Seleção do solvente de extração

A seleção do solvente de extração é um dos pontos fundamentais no desenvolvimento de um método de extração multirresíduo. Muitos aspectos devem ser considerados, entre eles: habilidade de extração de um amplo espectro de substâncias com diferentes polaridades, apresentar seletividade durante a extração, partição e limpeza (*clean-up*), compatibilidade com diferentes técnicas cromatográficas, baixo custo, segurança, além de observar a legislação ambiental (MASTOVSKÁ, 2004).

A utilização de ACN como solvente possibilita a extração de uma menor quantidade de interferentes lipofílicos provenientes da amostra, além disso ela proporciona a extração de uma ampla faixa de substâncias com diferentes polaridades (PRESTES, 2011). Já o metanol foi incluído na solução de extração, considerando que as quinolonas e tetraciclinas são mais solúveis neste solvente (LOPES et al., 2012). Além disso, avaliou-se a adição de ácido fórmico ao solvente de extração, considerando que ele pode melhorar a extração de certos compostos (ANASTASSIADES et al., 2003).

A partir das considerações apresentadas, visando-se obter a melhor eficiência de extração, foram realizados testes com três alternativas à solução de extração: ACN (100%); ACN:MeOH (1:1, v/v); e ACN:MeOH (1:1, v/v) contendo 1% de ácido fórmico. Esses testes foram realizados de forma univariada a partir do método de preparo de amostra inicial, em que as demais variáveis, tais como quantidade de amostra, volume de solução extratora, sais e limpeza, foram mantidas (Figura 5). De acordo com os resultados obtidos (Figura 7), a solução de extração composta apenas por ACN não foi capaz de extrair as tetraciclinas e resultou em baixa eficiência de extração para as quinolonas, já a solução de ACN:MeOH (1:1, v/v) foi capaz de extrair todas as substâncias, porém a solução de extração contendo ACN:MeOH (1:1, v/v) com 1% ácido fórmico apresentou o melhor resultado para

extração dos fármacos em estudos. Assim, selecionou-se com solução extratora a mistura ACN:MeOH com 1% ácido fórmico.

Figura 7. Avaliação do solvente de extração em termos de eficiência de extração

4.2.2 Seleção do volume do solvente de extração

Selecionada a composição da solução extratora ACN:MeOH (1:1, v/v) com 1% ácido fórmico, foi avaliado o volume do solvente de extração. Quando um maior volume de solução orgânica é utilizado, mais soluto deve dissolver-se nesta fase para manter constante a razão das concentrações e satisfazer a razão de distribuição, sendo possível aumentar a eficiência de extração dos analitos. Avaliou-se o emprego de dois volumes diferentes da solução de extração (5 e 10 mL), em que se teve, portanto, alteração na relação quantitativa entre amostra e solução de extração (1:1 e 1:2, m/v). As demais variáveis, tais como quantidade de sais e limpeza, foram mantidas. O aumento da proporção do volume do solvente em relação a massa de amostra, de 1:1 para 1:2, aumentou a eficiência de extração, promovendo valores superiores a 70% para todos os analitos, além disso, os valores

de desvio padrão foram menores. Assim, para compor o método desenvolvido, foi selecionado o volume de 10 mL de solvente de extração.

Figura 8. Avaliação do volume do solvente de extração

4.2.3 Seleção dos sais utilizados na etapa de *salting out*

Selecionada a composição e volume da solução extratora, foi avaliada a utilização de diferentes sais.

O uso de sais é útil para tornar um composto orgânico menos solúvel na fase aquosa, portanto, mais facilmente extraído pela fase orgânica. Neste caso ocorre uma dessolubilização do composto orgânico, ou seja, ele “salta para fora” (*salting out*) da camada aquosa para a camada orgânica. A força iônica da solução aquosa é aqui a responsável. A adição de sais também é utilizada para facilitar a remoção da água (proveniente da amostra) de solventes orgânicos, pois a força iônica do sal torna a fase aquosa menos compatível com a fase orgânica. Isso é útil principalmente quando a fase aquosa é parcialmente solúvel na fase orgânica e, portanto, difícil de remover (PAVIA, 2009).

A adição de sais para promover o efeito *salting out* é utilizada em vários métodos multiresíduos. Dependendo da natureza do solvente utilizado na etapa de partição, obtém-se melhores percentuais de eficiência de extração para analitos polares, pois como citado acima, a adição de sais diminui a solubilidade destes

compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa. A adição de sais é muito conveniente uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa (PRESTES, 2011).

No método do QuEChERS original é utilizado o MgSO_4 e NaCl para promover o efeito *salting out*, no entanto, também pode ser utilizado o MgSO_4 juntamente com o acetato de sódio (QuEChERS modificado) (ANASTASSÍADES et al., 2003).

No intuito de avaliar a eficiência de extração, foi tomado como base a quantidade de sais utilizada no método inicial e foi realizada uma comparação em termos de eficiências de extração obtidas pelo emprego do QuEChERS original (2g MgSO_4 e 0,5g NaCl), do QuEChERS modificado (2g MgSO_4 e 0,5g CH_3COONa) e do processo sem adição de sais. De acordo com os resultados obtidos (Figura 9), o QuEChERS original apresentou os melhores resultados para a extração dos fármacos em estudo, sendo assim o MgSO_4 e o NaCl foram utilizados no processo de extração.

Figura 9. Avaliação da influência dos sais no processo de extração

4.2.4 Seleção do sorvente utilizado na etapa de limpeza do extrato

Os diversos componentes da matriz podem ser co-extraídos com os analitos durante a extração, o que pode, por exemplo, reduzir a vida útil da coluna cromatográfica, interferir na detecção dos compostos alvos suprimindo ou incrementando os sinais analíticos (CABRERA, 2012). Considerando que uma maior limpeza do extrato pode diminuir o efeito matriz, melhorando a seletividade e detectabilidade do método, o uso de diferentes alternativas de sorventes são previstos no método QuEChERS. No presente trabalho foram avaliados o PSA (amina primária e secundária), o C₁₈ (octadecilsilano) e a quitosana como fase sólida dispersiva (dEFS) para a limpeza do extrato.

O sorvente PSA atua como um trocador aniônico e pode interagir com outros compostos através de pontes de hidrogênio ou interação do tipo dipolo-dipolo. Possui forte interação com os diversos constituintes de matriz biológica, sendo usado para remoção de interferentes. O PSA tem um elevado efeito quelante devido à presença dos grupos amino primário e secundário na sua estrutura. Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres, açúcares e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte contribuindo para a limpeza do extrato. (BORGES, 2015).

O sorvente C₁₈ promove uma limpeza mais efetiva em algumas matrizes, em especial aquelas que contêm gordura. É a opção mais utilizada para matrizes com teor de gordura maior que 2%, pois remove com boa eficiência os interferentes mais apolares, tais como substâncias graxas e lipídeos (BORGES, 2015).

A quitosana também possui capacidade de adsorver diversos compostos, como lipídeos, sugerindo potencial para ser empregada como mais uma alternativa ao sorvente no método QuEChERS visando a limpeza de extratos a partir de matrizes que possuam um elevado teor de gordura, como a carne de algumas espécies de peixes, por exemplo (AHMAD, 2005). A adsorção na quitosana pode acontecer de duas formas. Quando submetida a condições de pH ácido, ela se encontra na forma protonada, e a interação ocorre via atração eletrostática. Além disso, a presença de grupamentos amino possibilita a interação através da formação da ligação de hidrogênio (RINAUDO, 2006; DOTTO *et al.*, 2011).

Com o objetivo de garantir uma limpeza mais eficiente, contribuindo para uma maior vida útil de injetores e colunas cromatográficas, reduzindo a contaminação do sistema cromatográfico e minimizando o efeito matriz, foram avaliadas três opções diferentes na etapa de limpeza. Foram avaliados métodos a partir da utilização de 25mg mL^{-1} de PSA, 25mg mL^{-1} de quitosana e da combinação 25mg mL^{-1} de PSA e 25mg mL^{-1} de C_{18} . os resultados obtidos são apresentados na Figura 10, onde se observa que quando se utiliza na etapa de limpeza a combinação entre o PSA e o C_{18} , ocorre uma melhora na resposta de eficiência de extração dos fármacos alvos. Além disso, foi possível observar que após a corrida cromatográfica, o uso de PSA com C_{18} na limpeza do extrato permitiu que a fonte ESI do espectrômetro de massas se mantivesse mais limpa por mais tempo, provavelmente decorrente da eliminação de uma maior parte de interferentes quando comparada aos testes com as outras opções avaliadas. Assim, para este estudo foi utilizado na etapa de limpeza o PSA com C_{18} .

Figura 10. Avaliação dos sorventes utilizados na limpeza do extrato

4.2.5 Método de extração por QuEChERS nas condições definidas

Após os testes univariados nas diferentes etapas do método QuEChERS, nos quais foram avaliadas as eficiências de extração para os analitos alvos do presente

estudo, foi definida a condição final para compor o método de extração dos fármacos em filé de peixe. As etapas do processo de extração nas condições selecionadas estão descritas na figura 11.

Figura 11. Representação esquemática do processo de preparo da amostra nas condições selecionadas

4.3 Avaliação do desempenho analítico do método desenvolvido em filé de Tilápia

4.3.1 Seletividade e efeito matriz

A seletividade foi realizada através da comparação dos cromatogramas obtidos para a amostra branco de file de tilapia e amostra branco fortificada respectivamente, com os fármacos na concentração correspondente a 0,5 X o LMR e o PI (FNC) na concentração de 100 ng g⁻¹. A Figura 12 comprova a seletividade do método desenvolvido.

ALBENDAZOL

CIPROFLOXACINA

CLORTETRACICLINA

DIFLOXACINA

(Continuação)

ENROFLOXACINA

FENACETINA

OXITETRACICLINA

SULFAMETAZINA

SULFADIMETOXINA

SULFATIAZOL

(Continuação)

TETRACICLINA

Figura 12. Cromatogramas característicos para amostras branco e amostra branco fortificada de filé de tilápia, com os fármacos (0,5x LMR) e com a FNC (100ng g⁻¹)

Conforme pode ser observado nas Tabela 9, o efeito matriz para alguns fármacos foi significativo. Quando o procedimento indica a presença de efeito matriz, o MAPA estabelece que o analito seja quantificado utilizando curvas analíticas obtidas com a matriz branco fortificada ou a partir do extrato da matriz branco fortificada com o analito. Neste trabalho, utilizamos curvas analíticas a partir da matriz branco fortificada.

Tabela 9. Efeito matriz em três níveis de concentrações, compreendendo 0,5; 1,0 e 1,5 vezes o LMR de cada fármaco em estudo em filé de tilápia.

Concentração	ABZ	CIP	ENR	SDM	SMZ	STZ	CTC	OTC	TTC	DIF
0,5X LMR (n=3)	27	11,3	-15,6	4,4	34,8	17,7	25,9	23,7	20,7	13,4
CV(%)	2,9	3,4	3,8	2,9	3,7	1,8	3,7	1,8	3,8	1,8
1X LMR (n=3)	29,3	-11,1	-21,5	-3,8	24,1	1,1	14,1	24,1	5,4	3,9
CV(%)	1,7	3,3	3,1	1,9	2,1	1,8	4,1	1,1	2,2	1,5
1,5X LMR (n=3)	28,3	-7,1	-11,9	0,4	16,9	4,4	14,9	16,1	12,7	0,5
CV(%)	2,4	3,2	3,6	1,7	2,5	1,1	3,6	1,6	2,9	2,1

4.3.2 Curvas analíticas e linearidades

As curvas analíticas foram construídas mediante fortificação de amostras branco de filé em cinco níveis de concentração, contemplando a concentração correspondente ao LMR de cada fármaco, como sendo o nível central das mesmas (Tabela 4), usando a FNC (100 ng g^{-1}) como padrão interno. Após a fortificação, as amostras foram submetidas ao procedimento de preparo estabelecido para essa matriz. As curvas analíticas obtidas para os fármacos e as respectivas equações lineares estão apresentadas no apêndice B.

O método desenvolvido apresentou coeficiente linear superior a 0,99 para todos os analitos. Dessa forma, verifica-se que o método se mostrou adequado para a faixa linear estabelecida. Também foi realizado o teste de falta de ajuste para verificar o ajuste do modelo, sendo que todos os valores foram maiores que 0,05 (Tabelas 10 e 11), de modo que, com 95% de confiança, não há falta de ajuste linear nos modelos.

4.3.3. Precisão

A precisão do método foi determinada através das análises de repetitividade e precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial) do método analítico. Para isso, foi calculado o coeficiente de variação (CV %) para os três níveis de concentração, em quintuplicata. Os resultados estão apresentados na Tabela 10 (analitos com LMR de 100 ng g^{-1}) e Tabela 11 (analitos com LMR de 200 e 300 ng g^{-1}) e se encontram de acordo com os valores preconizados pelo guia de validação do MAPA (2011).

4.3.4 Veracidade/Recuperação

A veracidade foi avaliada mediante teste de recuperação. Foram preparadas amostras fortificadas em três níveis de concentração, compreendendo 0,5; 1,0; 1,5

vezes o LMR de cada analito em estudo, em cinco réplicas. As respostas foram avaliadas através do fator de recuperação (f_{rec}). Com pode ser observado na Tabela 10 (analitos com LMR de 100 ng g⁻¹) e Tabela 11 (analitos com LMR de 200 e 300 ng g⁻¹), os resultados obtidos estão de acordo com a faixa de aceitação (80 a 110%) preconizada pelo MAPA.

4.3.5 Limite de Decisão (CC_{α}) e Capacidade de Detecção (CC_{β})

O limite de decisão (CC_{α}) do método foi estimado pela soma da concentração correspondente ao LMR mais 1,64 vezes o desvio padrão obtido no ensaio de precisão intermediária.

A capacidade de detecção (CC_{β}) do método foi obtida pela soma da concentração correspondente ao LMR mais 3,28 vezes o desvio padrão obtido no ensaio de precisão intermediária.

De acordo com o MAPA (2011), os valores de CC_{α} e CC_{β} são sempre maiores que o LMR, devendo ser o mais próximo possível dele. Para todos os fármacos os valores de CC_{α} foram ligeiramente próximos ao LMR, verificando a concordância com as diretrizes seguidas. O MAPA também estabelece que o CC_{β} não deve ultrapassar mais de duas vezes o valor em fração da unidade do CV da tabela 5, conforme a faixa de concentração do analito, multiplicado pelo LMR (Equação 3). Com pode ser observado na Tabela 10 e 11, os valores de CC_{α} e CC_{β} determinados para os fármacos estão de acordo com a diretriz estabelecida pelo MAPA para o aceite de seus valores.

$$\text{Equação 3 } CC_{\beta} \leq (1 + 2 \times CV \text{ TABELA 5})/100 \times LMR$$

Tabela 10. Linearidade, repetitividade, precisão intermediária, recuperação, $CC\alpha$ e $CC\beta$ do método para análise dos fármacos com LMR 100 ng g⁻¹ em filé de tilápia.

Parâmetros	ABZ	CIP	ENR	SDM	SMZ	STZ
Linearidade	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
Falta de ajuste	0,38	0,44	0,57	0,18	0,08	0,28
Repetitividade						
50 (ng g ⁻¹ , n=5)						
CV(%)	3,96	6,81	6,55	1,63	4,84	1,82
Rec (%)	101	101	101	101	102	99
100 (ng g ⁻¹ , n=5)						
CV(%)	2,18	5,53	2,06	1,68	1,23	2,05
Rec (%)	100	101	97	101	99	101
150 (ng g ⁻¹ , n=5)						
CV(%)	1,72	2,86	2,08	3,14	3,96	3,94
Rec (%)	99	97	101	99	101	101
Precisão Intermediária						
50 (ng g ⁻¹ , n=5)						
CV (%)	2,83	6,35	11,07	3,33	9,19	4,9
Rec (%)	99	102	106	99	101	101
100 (ng g ⁻¹ , n=5)						
CV (%)	3,1	4,74	2,29	1,5	6,34	2,25
Rec (%)	100	102	96	99	98	99
150 (ng g ⁻¹ , n=5)						
CV (%)	0,92	1,91	3,08	5,8	3,38	0,19
Rec (%)	99	100	100	99	99	101
CCα (ng g⁻¹)	104	110	100	103	106	106
CCβ (ng g⁻¹)	109	118	104	109	116	114

Tabela 11. Linearidade, repetitividade, precisão Intermediária, recuperação, $CC\alpha$ e $CC\beta$ do método para análise dos fármacos com LMR 200 ng g⁻¹ e 300 ng g⁻¹ em filé de tilápia.

Parâmetros	CTC	OXT	TET	Parâmetros	DIF
Linearidade	>0,99	>0,99	>0,99	Linearidade	>0,99
Falta de ajuste	0,20	0,45	0,42	Falta de ajuste	0,37
Repetitividade				Repetitividade	
100 (ng g ⁻¹ , n=5)				150 (ng g ⁻¹ , n=5)	
CV(%)	6,55	6,58	9,09	CV(%)	4,54
Rec (%)	97	99	96	Rec (%)	103
200 (ng g ⁻¹ , n=5)				300 (ng g ⁻¹ , n=5)	
CV(%)	5,43	4,88	5,43	CV(%)	2,98
Rec (%)	101	101	102	Rec (%)	100
300 (ng g ⁻¹ , n=5)				450 (ng g ⁻¹ , n=5)	
CV(%)	4,95	4,6	5,34	CV(%)	1,91
Rec (%)	98	99	99	Rec (%)	101
Precisão Intermediária				Precisão Intermediária	
100 (ng g ⁻¹ , n=5)				150 (ng g ⁻¹ , n=5)	
CV (%)	3,27	4,28	10,15	CV (%)	3,33
Rec (%)	97	101	94	Rec (%)	101
200 (ng g ⁻¹ , n=5)				300 (ng g ⁻¹ , n=5)	
CV (%)	3,41	5,13	3,06	CV (%)	3,03
Rec (%)	101	101	101	Rec (%)	98
300 (ng g ⁻¹ , n=5)				450 (ng g ⁻¹ , n=5)	
CV (%)	1,15	1,64	3,15	CV (%)	1,03
Rec (%)	99	99	97	Rec (%)	99
CCα (ng g⁻¹)	204	217	214	CCα (ng g⁻¹)	309
CCβ (ng g⁻¹)	215	234	224	CCβ (ng g⁻¹)	323

4.4 Ampliação do escopo analítico

4.4.1 Avaliação do desempenho analítico do método desenvolvido em filé de pacu

A partir dos resultados satisfatórios de desempenho do método desenvolvido para determinação dos fármacos em filé de tilápia, decidiu-se avaliar a possibilidade de ampliação do escopo analítico do mesmo visando incluir nova matriz de interesse, no caso, filé de pacu. Para tanto, procedeu-se também a avaliação de desempenho analítico do método a partir de amostras branco de filé de pacu, utilizando os mesmos parâmetros e critérios recomendados pelo MAPA (2011).

4.4.1.2 Seletividade

A seletividade foi realizada através da comparação dos cromatogramas obtidos para a amostra branco de filé de pacu e amostra branco fortificada respectivamente, com os fármacos na concentração correspondente a 0,5 X o LMR e o PI (FNC) na concentração de 100 ng g⁻¹. A Figura 13 comprova a seletividade do método desenvolvido.

(Continuação)

Clortetraciclina

Difloxacin

Enrofloxacin

Fenacetina

Oxitetraciclina

Sulfametazina

(Continuação)

Sulfadimetoxina

Sulfatiazol

Tetraciclina

Figura 13. Cromatogramas característicos para amostras branco e amostra branco fortificada de filé de pacu, com os fármacos (0,5 X LMR) e com a FNC (100 ng g⁻¹)

Conforme pode ser observado nas Tabela 12, o efeito matriz para alguns fármacos foi significativo. Assim, para validação no filé de pacu também foi utilizada curva de calibração da matriz branca fortificada.

Tabela 12. Efeito matriz em três níveis de concentrações, compreendendo 0,5; 1,0 e 1,5 vezes o LMR de cada fármaco em estudo em filé de pacu.

Concentração	ABZ	CIP	ENR	SDM	SMZ	STZ	CTC	OTC	TET	DIF
0,5X LMR (n=3)	9,1	-23,4	-2,1	-3,7	74,1	15	71,5	-7,4	-23,6	-8
CV(%)	3,7	4,3	4,8	2,8	3,3	2,1	4,5	1,18	3,4	2,6
1X LMR (n=3)	13,1	-18,2	-16,3	-10	68,4	-1,7	72,1	6,8	-15,7	-2,8
CV(%)	2,9	3,7	3,3	2,1	2,9	1,9	3,9	1,03	2,8	1,8
1,5X LMR (n=3)	6,8	-24,4	-13,2	-8,7	73,5	3	69,9	-3,6	-16,8	-12,8
CV(%)	2,1	2,9	3,1	1,2	2,1	1,3	3,3	0,8	2,6	1,5

4.4.1.3 Curva analítica e linearidade

As curvas analíticas foram construídas mediante fortificação de amostras branco de filé de pacu nos mesmos cinco níveis de concentração empregados para a amostra de tilápia (Tabela 4), usando a FNC (100 ng g^{-1}) como padrão interno. Após a fortificação, as amostras foram submetidas ao mesmo procedimento de preparo descrito para tilápia. As curvas analíticas obtidas para os fármacos e as respectivas equações lineares estão apresentadas no apêndice C.

O método apresentou coeficiente linear superior a 0,99 para todos os analitos. Também foi realizado o teste de falta de ajuste das curvas para o filé de pacu, sendo que todos os valores foram maior que 0,05 (tabelas 13 e 14) e, portanto, com 95% de confiança, não houve falta de ajuste nos modelos lineares.

4.4.1.4 Linearidade, repetitividade, precisão intermediária, recuperação, $CC\alpha$ e $CC\beta$

Os testes para Repetitividade, Precisão Intermediária, Recuperação, $CC\alpha$, $CC\beta$ foram avaliados, e como pode ser observado na Tabela 13 e 14, os valores determinados para os analitos estão de acordo com a diretriz estabelecida pelo manual do MAPA (2011) para o aceite de seus valores.

Tabela 13. Linearidade, repetitividade, precisão intermediária, recuperação, $CC\alpha$ e $CC\beta$ do método para análise dos fármacos com LMR 100 ng g⁻¹ em filé de Pacu.

Parâmetros	ABZ	CIP	ENR	SDM	SMZ	STZ
Linearidade	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
Falta de ajuste	0,35	0,42	0,49	0,14	0,10	0,23
Repetitividade						
50 (ng g ⁻¹ , n=5)						
CV(%)	3,99	6	9,7	12,94	6,93	4,71
Rec (%)	106	97	93	109	103	97
100 (ng g ⁻¹ , n=5)						
CV(%)	3,03	3,78	2,16	10	5,14	4,11
Rec (%)	102	98	101	102	96	98
150 (ng g ⁻¹ , n=5)						
CV(%)	0,49	2,52	3,01	7,21	5,56	1,06
Rec (%)	96	99	98	99	99	99
Precisão intermediária						
50 (ng g ⁻¹ , n=5)						
CV (%)	4,43	6	5,11	3,25	5,62	3,04
Rec (%)	104	107	101	108	106	101
100 (ng g ⁻¹ , n=5)						
CV (%)	1,47	3,03	3,04	3,78	4,62	2,3
Rec (%)	102	101	102	105	97	99
150 (ng g ⁻¹ , n=5)						
CV (%)	2,14	2,24	3,27	0,94	1,88	1,31
Rec (%)	97	101	99	93	99	101
CCα (ng g⁻¹)	101	103	103	103	103	101
CCβ (ng g⁻¹)	103	108	108	109	111	104

Tabela 14. Linearidade, repetitividade, precisão intermediária, recuperação, $CC\alpha$ e $CC\beta$ do método para análise dos fármacos com LMR 200 ng g⁻¹ 300 ng g⁻¹ em filé de pacu.

Parâmetros	CTC	OXT	TET	Parâmetros	DIF
Linearidade	>0,99	>0,99	>0,99	Linearidade	>0,99
Falta de ajuste	0,30	0,41	0,45	Falta de ajuste	0,40
Repetitividade				Repetitividade	
100 (ng g ⁻¹ , n=5)				150 (ng g ⁻¹ , n=5)	
CV(%)	1,82	6,49	7,67	CV(%)	3,5
Rec (%)	93	96	90	Rec (%)	96
200 (ng g ⁻¹ , n=5)				300 (ng g ⁻¹ , n=5)	
CV(%)	6,45	5,37	8,81	CV(%)	2,3
Rec (%)	98	97	98	Rec (%)	98
300 (ng g ⁻¹ , n=5)				450 (ng g ⁻¹ , n=5)	
CV(%)	1,35	5,99	6,85	CV(%)	1,7
Rec (%)	100	99	99	Rec (%)	99
Precisão intermediária				Precisão intermediária	
100 (ng g ⁻¹ , n=5)				150 (ng g ⁻¹ , n=5)	
CV (%)	1,1	4,66	8,53	CV (%)	4,73
Rec (%)	103	101	101	Rec (%)	102
200 (ng g ⁻¹ , n=5)				300 (ng g ⁻¹ , n=5)	
CV (%)	4,09	3,25	5,02	CV (%)	3,64
Rec (%)	99	102	102	Rec (%)	97
300 (ng g ⁻¹ , n=5)				450 (ng g ⁻¹ , n=5)	
CV (%)	0,64	5,16	7,78	CV (%)	2,48
Rec (%)	101	102	102	Rec (%)	102
CCα (ng g⁻¹)	202	201	210	CCα (ng g⁻¹)	310
CCβ (ng g⁻¹)	214	211	225	CCβ (ng g⁻¹)	328

4.5 Aplicação do Método

Depois de desenvolvido o método analítico para a determinação dos 10 fármacos de interesse nas matrizes de filé de tilápia e pacu, e tendo os parâmetros de desempenho do método indicado que o mesmo é adequado à proposta pretendida no presente trabalho, foram adquiridas 20 amostras de filé de peixe em estabelecimentos comerciais da cidade de Ribeirão Preto, SP, sendo 10 amostras de cada espécie envolvida neste estudo. As amostras foram obtidas de cinco estabelecimentos diferentes (duas amostra de cada espécie por peixaria).

Nenhuma das amostras analisadas apresentou qualquer resíduo dos fármacos em estudo em níveis detectáveis pelo método desenvolvido.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento de um método analítico utilizando LC-MS/MS para a determinação simultânea de 10 fármacos (de 4 classes diferentes) em filés de duas espécies de peixe (tilápia e pacu). Os resultados obtidos para os parâmetros de avaliação do desempenho analítico foram satisfatórios para o fim a que se destinam, conforme o Manual de Garantia da Qualidade Analítica para Resíduos e Contaminantes em Alimentos, proposto pelo do Ministério de Agricultura Pecuária e Desenvolvimento, tomado como referência neste trabalho. O método baseou-se no procedimento de extração do tipo QuEChERS para extrair os analitos com diferentes propriedades físico-químicas, sendo que cada etapa foi avaliada por experimentos univariados. O método contou com um procedimento de preparo de amostra razoavelmente simples, com vantagem de não utilizar equipamentos sofisticados ou técnicas de extração laboriosas, podendo ser aplicado em qualquer laboratório. O método foi aplicado para a análise de amostras de filés de tilápia e pacu, disponíveis comercialmente em cinco peixarias na cidade de Ribeirão Preto, SP, sendo que os resultados não indicaram a presença dos analitos em níveis detectáveis.

6. REFERÊNCIAS

ABIMORAD, E.G.; CARNEIRO, D.J. 2004. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração protéica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Revista Brasileira de Zootecnia** 33(5): 1101-1109.

AHMAD, A.; SUMATHI, S.; HAMEED, B. Adsorption of residue oil from palm oil mill effluent using powder and flake chitosan: Equilibrium and kinetic studies. **Water Research**, v. 39, n. 12, p. 2483-2494, 2005.

Analytical methods for pesticide residues in foodstuffs, general inspectorate for health protection. 6th ed. **The Hage**; 1996.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 86:412, 2003.

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D. Crop protection, public health, environmental safety. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2007.

ANDERSSON, A.; PALSHEDEN, H. Comparison of the efficiency of different GLC multi-residue methods on crops containing pesticide residues. Fresenius' **Journal of Analytical Chemistry**, 339:365, 1991.

ANDRIOLE, V. The Quinolones. **New York: Academic Press**, 1999.

AOAC International. Official method 2007.01: pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate. **AOAC International**, 2007.

ARAÚJO, A. J. et al. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciênc. saúde coletiva**. v.12, n.1, jan.-mar.

BAMBEKE, F. V., Michot, J. M., Eldere, j. V., & Tulkens, P. M. (2005). Quinolones in 2005: an update. **Clinical Microbiology and Infection**, 11, 256-280.

BEYER A, BIZIUK M. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. **Food Chemistry**, 2008.

BORGES, B. B., et al. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Cap., 24, p. 230-243, 2015.

BORGHETTI, J.R.; CANZI, C. 1993. The effect of water temperature and feeding rate on the growth rate of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) raised in cages. **Aquaculture** 114, 93-101.

BOTSOGLOU, N.A.; FLETOURIS, D.J. Drug Residues in Foods, Pharmacology, Food Safety, and Analysis. Marcel Dekker, New York. 2001.

BOWSER, P. R.; BABISH, J. G. Clinical pharmacology and efficacy of fluoroquinolones in fish. **Annual Rev. of Fish Diseases**. p. 63-66, 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 13, de 15 de julho de 2015. Publica o subprograma de monitoramento e subprograma exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC de 2015 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, eqüina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 jul. 2015.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico de pesca e aquicultura do Brasil 2011. Brasília: República Federativa do Brasil, 2013a.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Censo aquícola nacional, ano 2008. Brasília: República Federativa do Brasil, 2013b.

BULDINI, P. L.; RICCI, L.; SHARMA, J. L. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 47-70, 2002.

BUSATTO, Z., SILVA, A. F. B. Freitas, O. PASCHOAL. A. Z. Food Additives & Contaminants : Part A LC-MS / MS methods for albendazole analysis in feed and its metabolite residues in fish fillet and a leaching study in feed after an alternative

procedure for drug incorporation. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 0(0), 1–11, 2017.

CABRERA, L. C. et al. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, 4(3):227-240, 2012.

CAMPOS, J.L. A falta de produtos registrados para uso em aquicultura no Brasil: Uma brecha para a imposição de barreiras comerciais e riscos para os consumidores. **Panorama da Aqüicultura**, v.15, n.87, p.14-23, 2005.

CANADA-CANADA F.; ESPINOSA MANSILLA A.; JIMÉNES GIRÓN A.; MUNOZ DE LA PENA A. (2012): **Simultaneous determination of the residues of fourteen quinolones and fluoroquinolones in fish samples using liquid chromatography with photometric and fluorescence detection**. Czech J. Food Sci., **30**: 74–82.

CARRASCHI, P. S., et al. Effectiveness of therapeutic agents in disease treatment in *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v. 431, p. 124-128, 2014.

CASTELLARI, M.; GARCÍA-REGUEIRO, J.A. HPLC determination of tetracyclines in lamb muscle using an RP-C₁₈ monolithic type column. **Chromatographia**, v.58, p.789-792, 2003.

CAZZOLA, M.; BLASI, F.; CENTANNI, S.; DONNER, C.F.; ALLEGRA, L. Advances in the research and development of chemotherapeutic agents for respiratory tract bacterial infections. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, v.14, p.367-381, 2001.

CHOI, S. Development and verification for analysis of pesticides in eggs and egg products using QuEChERS and LC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1236-1242, 2015.

CHUNG-WEI, T.; CHAN-SHING, L.; WEI-HSIEN, W. Multi-Residue Determination of Sulfonamide and Quinolone Residues in Fish Tissues by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). **Journal of Food and Drug Analysis**, Vol. 20, No. 3. Pag. 674-680, 2012.

COOK J, Becket MP, Reliford B, Hammock W, Engel M. residue analysis of pesticides in fresh fruits and vegetables using procedures developed by the Florida

Department of Agriculture and Consumer Services. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 82:1419, 1999.

COSTA, R. P., et al. **Tilosina: um importante antibiótico não monitorado em leite no Brasil**. Segurança Alimentar e Nutricional. Campinas, 245-259, 2013.

CUNHA SC, LEHOTAY SJ, MASTOVSKA K, FERNANDES JO, OLIVEIRA BMPP. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. **Journal of Separation Science**, 30:620, 2007.

DASENAK, M. E., & THOMAIDIS, N. S. Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC-ESI-MS/MS approach based on advanced mass spectrometric techniques. **Analytica Chimica Acta**, 672(1–2), 93–102, 2010.

DAYAN, A. D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. **Acta Tropica**, 86:141–59, 2003.

DIAS, M. T. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. **Embrapa Amapá**, 2009.

DMITRIENKO, S. G. et al. Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection – a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 850, p. 6-25, 2014.

DOTTO, G. L.; VIEIRA, M. L. G.; GONÇALVES, J. O.; PINTO, L. A. A.. Remoção dos corantes azul brilhante, amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina de soluções aquosas utilizando carvão ativado, terra ativada, terra diatomácea, quitina e quitosana: estudos de equilíbrio e termodinâmica. **Quim. Nova**, Vol. 34, No. 7, 1193-1199, 2011.

DRLICA, K. Mechanism of fluoroquinolone action. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.2, p.504-508, 1999.

Enfermidades Bacterianas de peixes: akane.udenar.edu.co/siweb/acuicola/revista/archivo/a1vol1/conf20.pdf.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission Decision 2002/657/CE of 12 august 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of

analytical methods and the interpretation of results. **Official journal of the European Communities**, L 221/8, 2002.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. CEN, CEN/TC 275 15662:2008: foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/ partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method. **European Union**, 2008.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014. Fishery and aquaculture statistics 2012. Roma: FAO yearbook.

FAO/OIE/WHO ,Report of a Joint FAO/OIE/WHO **Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance**. Issued by the World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Organisation for Animal, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Fishery and aquaculture statistics**. Roma, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **State of World Aquaculture**. Roma, 2006.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Fish and fishery products hazards and controls guidance**. Chapter 11: **Aquaculture drugs**. 4a Edition, 2011.

FURLANETO, F.P.B., et al. **Custo e rentabilidade da produção de tilápia (*Oreochromis spp.*) em tanques-rede no Médio Paranapanema, estado de São Paulo, safra 2004/05**. Informações Econômicas, v.36, n. 3, p. 63-69, 2006.

GOODMAN, A.; As bases farmacológicas da terapêutica. McGraw Hill, Cidade do México. p. 1436, 1996.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Princípios da utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. 1.ed, Porto Alegre, cap. 1, p. 17-30, 2008.

GUGKIELMETTI, E.; KORHONEN, J.; HEIKKINEN, J.; MORELLI, L.; WRIGHT, A. *FEMS Microbiology. Letters*, 293, 28-34, 2009.

GUIDI, L. R., SANTOS, F. A., RIBEIRO, A. C. S. R., FERNANDES, C., SILVA, L. H. M., & GLORIA, M. B. A. A simple, fast and sensitive screening LC-ESI-MS/MS method for antibiotics in fish. **Talanta**, 2017.

HASHIMOTO, J., PASCHOAL J., QUEIROZ J., REYES F. Considerations 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**. 20: 273 – 294, 2011.

HERNÁNDEZ-ARTESEROS, J.A.; BARBOSA, J.; COMPAÑÓ, R.; PRAT, M.D. Analysis of quinolone residues in edible animal products. **Journal of Chromatography A**, v.945, p. 1-24, 2002.

HERNANDO, M.D.; MEZCUA, M. SUAREZ-BARCENA, J.M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry for simultaneous determination of chemotherapeutant residues in salmon. **Analytica Chimica Acta**, v.562, p.176-184, 2006.

HYOTYLAINEN, T. On-line coupling of extraction with gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, 2008.

IBGE. **Produção da pecuária municipal**. Instituto Brasileiro de Geografia E Estatística, 44, 1–51, 2016.

INTERNACIONAL STANDARDS ORGANIZATION (ISO). **Capability of detection-part 1: terms and definitions**. Geneva, 10p. ISO 11843-1, 1997.

JOHNSTON, L.; MACKAY, L.; CROFT, M. Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.982, p.97-109, 2002.

JOHNSTON, L.; MACKAY, L.; CROFT, M. Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.982, p.97-109, 2002.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES- JECFA. **Toxicological Monographs**, 2007.

JOKANOVIC, M., STUKALOV, P.V., KOSANOVIC, M. Organophosphate induced delayed polyneuropathy. **Curr. Drug Target CNS Neurol. Disord.**, v. 1, p. 593-602, 2002.

JOMORI, R.K.; DUCATTI, C.; CARNEIRO, D.J.; PORTELLA, M.C. 2008. Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. *Aquaculture Research* 39, 370-381.

JSA. Federal Joint Subcommittee on Aquaculture. **Guide to drug, vaccine and pesticide use in aquaculture**, 2007.

JUAREZ, L.M.; ROUSE, D.B. **Acute toxicity of trichorfon to juvenile freshwater prawn. Progressive Fish-Culturist.** v.45, n.4, p.214-216, 1983.

JUNIOR, O. I. **Princípios de farmacologia básica. Farmacologia dos antimicrobianos.** 2. Ed, Rideel, São Paulo, cap. 15, p. 221-236, 2012.

KINSELLA, B. et al. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p. 7977-8015, 2009.

KLIMEK-TUREK, A. et al. Frontally eluted components procedure with thin layer chromatography as a mode of sample preparation for high performance liquid chromatography quantitation of acetaminophen in biological matrix. **Journal of Chromatography A**, v. 1436, p. 19-27, 2016.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Sulfonamidas. In Química farmacêutica.** Tradução de Andrejus korolkovas. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982, p. 547-559.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. de A. C. **Dicionário terapêutico Guanabara.** 16. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Editora Aqua Supre Comércio de Suprimentos para Aqüicultura Ltda. Jundiaí, 285 p. 2000.

KUBITZA, F.. Transporte de Peixes Vivos. *Revista Panorama da Aqüicultura*, 7 (43), 20-26, 1997.

HENNESSY, D. R. The disposition of antiparasitic drugs in relation to the development of resistance by parasites of livestock. *Acta Trop.* 56 (1994) 125–141.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review. **Analytical and Bionalytical Chemistry**, v. 389, n. 6, p. 1663-1683, 2007.

LEHOTAY, S.J; SON, K. A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOON, N.; Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal Chromatography A* 1217 (2010a) 2548.

LEHOTAY, S.J., MASTOVSKA, K., YUN, S.J. Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. *Journal of AOAC International* 88 (2005) 630.

LESHER, G.Y.; FROELICH, E.D.; GRUET, M.D. 1,8 naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. **Journal of Medical Pharmacological Chemistry**, v.5, p.1063-1068, 1962.

LIMA, L.C.; LEITE, R.C. Boas coletas garantem bons diagnósticos. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, v. 16, n. 96, p. 24-29, 2006.

LIU, Y., YANG, H., YANG, S., Hu, Q., CHENG, H., LIU, H., & QIU, Y. High-performance liquid chromatography using pressurized liquid extraction for the determination of seven tetracyclines in egg, fish and shrimp. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 917–918, 11–17, 2013.

LOPES, R. P., REYES, R. C., ROMERO-GONZÁLEZ, R., VIDAL, J. L. M., & FRENICH, A. G. Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 895–896, 39–47, 2012.

ANASTASSIADES, M. S.J. LEHOTAY, D.Â. TAJNBAHER, F.J. SCHENCK, J. AOAC Int. 86 (2003) 412.

MARTINEZ V.JL, ARREBOLA L.FJ, GONZALES R.MJ, GARRIDO F. A, FERNANDES, JL. Validation of a gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry based method for the quantification of pesticides in food commodities. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, 20:365, 2005.

MARTINEZ, F.; AVILA, C.M.; GOMEZ, A. Thermodynamic study of the solubility of some sulfonamides in cyclohexane. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, p.803-808, 2003.

MARTINS, M.L.; MORAES; R.R. FUJIMOTO; D.T. NOMURA; J. FENERICK JR. 2002. Respostas do híbrido tambacú (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 macho X *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. Boletim do Instituto de Pesca 28(2): 195-204.

MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J.; J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **J Chromatogr. A**. Jun 25;1040(2):259-72, 2004.

MENDONÇA, R.L. **Avaliação de métodos multirresíduos de preparo de amostra para determinação de antimicrobianos em alimentos: QueChERS e MEPS**. Tese (Doutorado em Química Analítica). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2012.

MICHAEL T. Madigan, JOHN M. MARTINKO. Microbiologia de Brock. 14^a Edição. Editora Grupo A Educação, 2016.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO– MAPA. **Manual da garantia da qualidade anasxzlítica**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 227p, 2011.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO (MEC). **Aquicultura**, Brasília, 2006.

MOLINA-RUIZ, J. M.; CIESLIK, E.; CIESLIK, I.; WALKOWSKA, I. Determination of pesticide residues in fish tissues by modified QuEChERS method and dual-d-SPE clean-up coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015 Jan;22(1):369-78.

NATA (National Association of Testing Authorities - Australia). **Technical note 17. Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods**. Sydney: NATA, 8p, 1997.

NOGRADY, T.; WEAVER, D. F. Nonmessenger targets for drug action III: exogenous pathogens and toxins. **Medicinal chemistry: a molecular and biochemical approach**. Oxford. Oxford University, p. 453-599, 2005.

OKA, H.; ITO.; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J Chromatogr A*, 16;882(1-2):109-33, 2000.

OLIVEIRA, R.C. **O panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade**. Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, vol.2, nº1, p. 73-89. 2009.

ORLANDO, E. A., & SIMIONATO, A. V. C. Extraction of tetracyclenic antibiotic residues from fish filet: Comparison and optimization of different procedures using liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1307, 111–118, 2013.

PASCHOAL, J.A.R. **Resíduos de antimicrobianos em peixe: depleção residual e desenvolvimento de métodos analíticos**. Tese (Doutorado em Química Analítica). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.

PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1190–1198, 2008.

PASTOR-NAVARRO, N.; GALLEGU-IGLESIAS, E.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R. Development of a group specific immunoassay for sulfonamides application to bee honey analysis. *Talanta*, v.71, p.923-933, 2007.

PAULA, F. C. S.; CARVALHO, S.; DUARTE, H. A.; PANIAGO, E. B.; MANGRICH, A. S.; PEIREIA-MAIA, E. C.; *J. Inorg. Biochem.* **1999**, 76, 221.

PAVANELLI, G.; EIRAS, J.; TAKEMOTO, R. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 2nd ed. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 305p, 2002.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., ENGEL, R. G. **Química Orgânica Experimental: Técnicas de escala pequena**. 2a. Ed., Porto Alegre, Bookman, 2009.

PIZZUTTI IR, KOK A, ZANELLA R, ADAIME MB, HIEMSTRA M, WICKERT C, PRESTES OD. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, 1142:123, 2007.

PLUMB, J.A. Overview of warm-water fish diseases. In: LIM, C.; WEBSTER, C.D. (Ed.). Nutrition and fish health. New York: Food Product Press, 2001. p. 1-9.

PRESTES, O. D., *et al.* O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 5, 697-710, 2013.

PRESTES, O. D., *et al.* QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multiresíduos de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 6, 1620-1634, 2009

PRESTES, O. D., *et al.* QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multiresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, 3(1):51-64, 2011.

RAMOS, F. M.M.; RAMOS, M.I.L.; HIANE, P.A.; SOUZA E.M.T. 2008. Perfil lipídico de quatro espécies de peixes da região pantaneira de Mato Grosso do Sul. *Ciência e tecnologia de alimentos* 28(2): 361-365.

RAMSEY, F. L., and D. W. SCHAFER, 1997. **The statistical sleuth: A course in methods of data analysis**. Belmont, Calif.: Duxbury Press.

RANA, K. J. 1997. **Guidelines on the collection of structural aquaculture statistics**. Supplement to the Program for the world census of agriculture 2000. FAO Statistical Development Series, 5b. Roma, FAO 56 p, 2000.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. **Open Chemistry**, v. 13, p. 980-1010, 2015.

REZK, M. R., RIAD, S. M., KHATTAB, F. I., & MARZOUK, H. M. Multi-residues determination of antimicrobials in fish tissues by HPLC-ESI-MS/MS method. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 978–979, 103–110, 2015.

RICO, A.; VAN DEN BRINK, P. J. Probabilistic risk assessment of veterinary medicines applied to four major aquaculture species produced in Asia. **Since of the Total Environment**, v. 468-469, p. 630-641, 2014.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

ROSS A. POTTER, B. GARTH B. JEFFREY M. VAN DE RIET H. North, and R. D. Simultaneous Determination of 17 Sulfonamides and the Potentiators Ormetoprim and Trimethoprim in Salmon Muscle by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry Detection. **Journal of AOAC International**, 90(1), 343–349, 2007.

ROTTA, M. A.; QUEIROZ, J. F. Boas práticas de manejo (BPMs) para a produção de peixes em tanques-redes. Corumbá: **Embrapa Pantanal**, 27 p., 2003.

SÁEZ-LLORENS, X. et al. Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country. **Pediatr Infect Dis J**. v. 19, p. 200-206. 2000.

SAITO Y, KODAMA S, MATSUNAGA A, YAMAMOTO A. Multiresidue Determination of Pesticides in Agricultural Products by Gas Chromatography/Mass Spectrometry

with Large Volume Injection. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 87:1356, 2004.

SAMANIDOU, V. E.; ANGGELOPOULOU, E.; TRÖZZMÜLLER, M.; GUO, X.; LANKMYR, E. Multi-residue determination of seven quinolones antibiotics in gilthead seabream using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n.1203, p 115-123, 2008.

SAMANIDOU, V. F.; TOLIKA, E. P.; PAPADOYANNIS, I. N. Chromatographic residue analysis of sulfonamides in foodstuffs of animal origin. **Separation and Purification Reviews**, v. 37, p. 327-373, 2008.

SAMUELSEN, O.B. Pharmacokinetics of quinolones in fish: a review. **Aquaculture**, v. 255(1–4), p.55–75, 2006.

SANTOS, C. A. M. L.; HOWGATE, P. Fishborne zoonotic parasites and aquaculture: a review. **Aquaculture**, v. 318, p. 253-261, 2011.

SANTOS, C. Aquicultura e pesca: a mudança do modelo exploratório. Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. **Embrapa Amapá**, v. 1, cap., 1, p. 13-32, 2009.

SANTOS, L.; RAMOS, F. Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p. 16-30, 2016.

SCHENCK, F. J.; HOBBS, J. E. Evaluation of the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) Approach to Pesticide Residue Analysis. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, 73:24–30, 2004.

SCHMAHL, G., BENINI, J. Treatment of fish parasites. 11. Effects of different benzimidazole derivatives (albendazole, mebendazole, fenbendazole) on *Glugea anomala*, Moniez, 1887 (Microsporidia): ultrastructural aspects and efficacy studies. **Parasitology Research**, v. 84, p. 41–49, 1998.

SCHNEIDER, M. J., DARWISH, A. M., & FREEMAN, D. W. Simultaneous multiresidue determination of tetracyclines and fluoroquinolones in catfish muscle using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, 586, 269–274, 2007.

SEPAQ. Secretaria de estado de pesca e aquicultura, Governo do Pará. **Conceitos e Informações sobre aquicultura**, 2014.

SERRANO, P. H.. *FAO Fisheries Technical Paper. Responsible use of antibiotics in aquaculture*. 469, 97 pág. FAO Roma, 2005.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS–SEBRAE. **Aquicultura no Brasil: série estudos mercadológicos**. Brasília, DF, 2015.

SHLAES, D. M.; Curr. Opin. Investig. Drugs **2006**, 7, 167.

SINDAN - **Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal**, 2016. Disponível em: <http://www.sindan.org.br>.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Anal. Chim. Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

SPEARE, D.J. et al. A preliminary investigation of alternatives to fumagillin for the treatment of *Loma salmonae* infection in rainbow trout. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, n. 3, p. 241-248, 1999. SPINOSA, H. de S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SPINOSA, H. de S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SU, S.C.; CHANG, M.H.; CHANG, C.L.; CHANG, P.C.; CHOU, S.S. Simultaneous determination of quinolones in livestock and marine products by high performance liquid chromatography. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.2, p.114-127, 2003.

TOJO, J.L.; SANTAMARINA, M.T. Oral pharmacological treatments for parasitic diseases of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. I: Hexamita salmonis. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 33, p. 51-56, 1998.

TORTORA, G. J., FUNKE R. B., CASE C. L. **Microbiologia**. Editora Atheneu, São Paulo, 6a edição, 2005.

UENO E, OSHIMA H, Saito I, MATSUMOTO H, YOSHIMURA Y, NAKAZAWA H. Multiresidue Analysis of Pesticides in Vegetables and Fruits by Gas Chromatography/Mass Spectrometry after Gel Permeation Chromatography and Graphitized Carbon Column Cleanup. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 87:1003, 2004.

UENO, R.; SANGRUNGRUANG, K.; MIYAKAWA, M. A simplified method for the determination of several fish drugs in edible fish and shrimp by high-performance liquid chromatography. **Food Research International**, v. 32, p.629-633, 1999.

WALSH, C.; Antibiotics: Actions, Origins, Resistance, **ASM Press**, Washington, 2003.

WEN, Y.; WANG, Y.; FENG, Y.Q. Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v.70, p.153- 159, 2006.

WU, Z. et al. Development and optimization of a rapid HPLC method for analysis of ricobendazole and albendazole sulfone in sheep plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 225-232, 2005.

YU, D. et al. Residue depletion of albendazole and its metabolites in aquacultured yellow perch (*Perca flavescens*). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, p. 560-562, 2011.

ZHANG, L. et al. A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 900-925, 2012.

Apêndices

APÊNCIDE A- Espectro de Massas dos fármacos: Íons Produtos

ALBENDAZOL

CIPROFLOXACINA

CLORTETRACICLINA

DIFLOXACINA

ENROFLOXACINA

SULFADIMETOXINA

SULFAMETAZINA

SULFATIAZOL

OXITETRACICLINA

TETRACICLINA

APÊNCIDE B- Curvas analíticas para os fármacos obtidas para o método desenvolvido para a quantificação dessas substâncias em file de tilápia por LC-MS/MS.

APÊNCIDE C- Curvas analíticas para os fármacos obtidas para o método desenvolvido para a quantificação dessas substâncias em file de pacu por LC-MS/MS.