UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

SARAH CHAGAS CAMPANHARO

**Desenvolvimento de método analítico envolvendo QuEChERS
modificado e DLLME para a determinação de resíduos de
eritromicina em peixe por LC-MS/MS**

Ribeirão Preto

2021

SARAH CHAGAS CAMPANHARO

**Desenvolvimento de método analítico envolvendo QuEChERS
modificado e DLLME para a determinação de resíduos de
eritromicina em peixe por LC-MS/MS**

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato
Paschoal.

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 14/06/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2021

<p>CAMPANHARO, S. C.</p>	<p>Desenvolvimento de método analítico envolvendo QuEChERS modificado e DLLME para a determinação de resíduos de eritromicina em peixe por LC-MS/MS</p>	<p>Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca</p>	<p>MESTRADO</p> <p>FCFRP USP</p> <p>2021</p>
------------------------------	--	--	--

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.

‘

Campanharo, Sarah Chagas.

Desenvolvimento de método analítico envolvendo QuEChERS modificado e DLLME para a determinação de resíduos de eritromicina em peixe por LC-MS/MS.

Ribeirão Preto, 2021. 143 p.

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

Orientador: Paschoal, Jonas Augusto Rizzato.

1. Eritromicina. 2. QuEChERS. 3. DLLME. 4 Segurança alimentar. 5. Aquicultura

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Sarah Chagas Campanharo

Título do trabalho: Desenvolvimento de método analítico envolvendo QuEChERS modificado e DLLME para a determinação de resíduos de eritromicina em peixe por LC-MS/MS

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ - Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ - Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ - Assinatura: _____

Dedico a conclusão do curso de mestrado à minha família, em especial aos meus pais, Sidnei e Nilza e aos meus irmãos, Diego e Daniel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito à Deus pela vida, por minha saúde e pela saúde da minha família e de todos que amo.

Agradeço à minha família por acreditarem em mim sempre, por estarem presentes nos momentos bons e nos difíceis e pelo amor incondicional. Muito obrigada pelo apoio!

Ao meu companheiro Antônio pela parceria, por todo o amor e paciência.

Agradeço ao professor Dr. Jonas Paschoal pela confiança e pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Por todos os ensinamentos, todas as conversas e pela orientação. Sempre serei grata.

Aos meus colegas de laboratório Juliana, Carol, Carlos, João, Marina e especialmente ao Jonas, ao Lucas e à Thaís, por me ajudarem nas atividades, por terem trabalhado muito comigo, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Ao técnico do laboratório, Agnaldo, que esteve comigo na realização dos experimentos, compartilhando seu conhecimento, com muita paciência e me ajudando em todos os desafios.

Agradeço aos professores que colaboraram no desenvolvimento deste trabalho, em especial à professora Dra. Fabiana Pilarski, do Centro de Aquicultura da UNESP de Jaboticabal e professora Dra. Priscyla D. Gaspari, do laboratório de Nanobiotecnologia.

Agradeço ao professor Dr. Jairo Kenupp Bastos do Laboratório de Farmacognosia, pela gentileza de fornecer as amostras de óleo volátil de Copaíba.

Agradeço também aos técnicos de outros laboratórios que me auxiliaram: Henrique Dias, Perpétua, Laila, Patrícia e especialmente à Taís. Obrigada por serem tão gentis comigo.

Aos alunos da professora Fabiana, especialmente ao Inácio, pela ajuda com os experimentos com os animais, pelo companheirismo, confiança e seriedade em seu trabalho.

Às alunas da professora Dra. Priscyla, especialmente à Bianca e à Letícia, por me receberem tão bem no laboratório e pelo auxílio nos testes de desenvolvimento das nanopartículas.

Agradeço muito a todos os professores das disciplinas que cursei neste período e aos professores que tive a oportunidade de conhecer em palestras e workshops. Obrigada por tudo que me ensinaram.

Agradeço aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, especialmente aos funcionários da pós-graduação, Henrique e Eleni, que sempre foram gentis comigo e se dispuseram a me auxiliar.

Agradeço aos colegas de pós-graduação que conheci nesta jornada, especialmente ao Rodolfo, pelo incentivo, pelas conversas e momentos de descontração.

Agradeço à FAPESP pelo apoio ao projeto de pesquisa, pelas avaliações, críticas, sugestões e pelo auxílio financeiro (2012/18334-0 e 2019/06159-8) e pela bolsa de estudos concedida (2018/05536-0).

Agradeço também ao CNPq, pelo apoio à pós-graduação e pelo auxílio financeiro (132655/2018-7).

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

Muito obrigada a todos!

RESUMO

CAMPANHARO, S. C. Desenvolvimento de método analítico envolvendo QuEChERS modificado e DLLME para a determinação de resíduos de eritromicina em peixe por LC-MS/MS. 2021. 143 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Ainda que as ferramentas analíticas venham evoluindo significativamente ao longo dos anos, a determinação de concentrações de compostos orgânicos a níveis residuais (por exemplo, $<10 \mu\text{g kg}^{-1}$) em matrizes complexas como os tecidos biológicos, continua sendo um grande desafio no desenvolvimento analítico. A carne de peixe (músculo e pele em proporções naturais), assim como outros alimentos, é uma matriz complexa por possuir diversos compostos que podem ser co-extraídos com o(s) analito(s) alvo(s), afetando a seletividade e, conseqüentemente, a detectabilidade/sensibilidade e precisão do método. Neste trabalho, um procedimento moderno de preparo de amostra foi desenvolvido, otimizado e validado para determinação de resíduos de eritromicina (ERI) em carne de peixe. O método apresentou adequada linearidade ($r>0,99$, homocedástico), alta detectabilidade ($LQ 1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$), precisão ($CV<6,3\%$) e exatidão ($ER<9,62\%$), visando avaliar o perfil de depleção residual do ativo após administração oral em peixes provenientes de um estudo experimental. O preparo de amostra envolveu o uso do procedimento QuEChERS modificado associado à microextração líquido-líquido dispersiva e um sistema analítico LC-MS/MS. Para promover a administração oral do medicamento aos peixes, um método de incorporação de ERI em ração foi desenvolvido e validado (linearidade com $r>0,99$, homocedástico; precisão com $CV<2,1\%$; veracidade com $CV<2,2\%$). A eficiência de incorporação do ativo foi de 72% e o método foi capaz de produzir ração com adequada homogeneidade ($CV<2,0\%$) da concentração de ERI e baixa lixiviação ($<1,1\%$) do ativo quando em contato com a água por até 15 minutos. O estudo de depleção foi realizado em peixes da espécie pacu e envolveu um tratamento com a ração medicamentosa na dose oral diária de $100 \text{ mg (kgPV)}^{-1}$, durante 7 dias consecutivos. A temperatura média da água foi de 30°C , e o período de carência mínimo estimado foi de 8 dias (ou 240 Graus-dia) para eliminação dos resíduos de ERI a níveis abaixo da concentração considerada segura para essa substância (LMR $100 \mu\text{g kg}^{-1}$), com 95% de confiança e considerando o limite de tolerância de 99%.

Palavras-chave: Eritromicina, QuEChERS, DLLME, segurança alimentar, aquicultura.

ABSTRACT

CAMPANHARO, S. C. Development of an analytical method using modified QuEChERS and DLLME for the determination of erythromycin residues in fish by LC-MS/MS. 2021. 143 p. Dissertation (Master). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto – University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2021.

Even though analytical tools have evolved significantly over the years, determining concentrations of organic compounds at residual levels (for example, $<10 \mu\text{g kg}^{-1}$) in complex matrices such as biological tissues, remains a major challenge in analytical development. Fish meat (muscle and skin in natural proportions), as well as other foods, is a complex matrix because it has several compounds that can be co-extracted with the target analyte (s), affecting selectivity and, consequently, the detectability/sensitivity and precision of the method. In this work, a modern sample preparation procedure was developed, optimized and validated for the determination of erythromycin (ERI) residues in fish meat. The method presented adequate linearity ($r > 0.99$, homoscedastic), high detectability (LOQ $1.0 \mu\text{g kg}^{-1}$), precision (CV $<6.3\%$) and accuracy (ER $<9.62\%$), aiming to evaluate the residual depletion profile of ERI after oral administration in fish from an experimental study. Sample preparation applies the use of the modified QuEChERS procedure associated with dispersive liquid-liquid microextraction and an LC-MS/MS analytical system. To promote oral administration of the drug to fish, a method of incorporating ERI into feed was developed and validated (linearity with $r > 0.99$, homoscedastic; accuracy with CV $<2.1\%$; veracity with CV $<2.2\%$). The efficiency of incorporation of ERI into feed was 72% and the method was able to produce feed with adequate homogeneity (CV $<2.0\%$) of the ERI concentration and low leaching ($<1.1\%$) of the compound when in contact with the water for up to 15 minutes. The depletion study was carried out on pacu fish and involved a treatment with the medicated feed at a daily oral dose of $100 \text{ mg (kgPV)}^{-1}$, during 7 consecutive days. The average water temperature was 30°C , and the minimum withdrawal period estimated was 8 days (or 240 degree-day) for elimination of ERI at levels below the concentration considered safe for this substance (MRL $100 \mu\text{g kg}^{-1}$), with 95% confidence and considering the tolerance limit of 99%.

Keywords: Erythromycin, QuEChERS, DLLME, food safety, aquaculture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção da piscicultura brasileira por espécie, em toneladas, no ano de 2018. Fonte: IBGE/PPM, 2019.	8
Figura 2. Estrutura química da Eritromicina A.	13
Figura 3. Gráfico do número de registros encontrados na busca pelo tópico QuEChERS na base de dados Web of Science entre os anos 2010 e 2020.	20
Figura 4. Representação do procedimento QuEChERS original. Fonte: adaptado de Zanella et al., 2015a.	20
Figura 5. Gráfico do número de registros encontrados na busca pelo tópico DLLME na base de dados Web of Science entre os anos 2010 e 2020.	23
Figura 6. Diagrama simplificado da DLLME. Fonte: adaptado de Quigley; Cummins; Connolly, 2016.	24
Figura 7. Estrutura química da Eritromicina-d6. Fonte: Toronto Research Chemicals (E649953).	36
Figura 8. Estrutura química da Fenacetina. Fonte: NCBI.	36
Figura 9. Esquema da etapa QuEChERS do procedimento de extração de ERI da carne de pacu.	44
Figura 10. Esquema da etapa DLLME do procedimento de extração de ERI da carne de pacu.	45
Figura 11. Cromatogramas referentes ao teste de seletividade do método para análise de ração: solução diluente, matriz branco, ERI em solução, matriz fortificada com ERI, FEN em solução e matriz fortificada com FEN.	61
Figura 12. Cromatogramas referentes a amostras de ração branco e de ração contendo o analito ERI e o padrão interno FEN, analisadas pelo método proposto para a ração, nas transições monitoradas durante as análises.	61
Figura 13. Curva analítica em matriz fortificada com ERI resultante de três curvas preparadas para o teste de linearidade.	63
Figura 14. Gráficos da dispersão de resíduos das três curvas analíticas avaliadas na linearidade.	64
Figura 15. Gráfico de Pareto de efeitos padronizados para avaliação dos fatores no procedimento QuEChERS.	67

Figura 16. Gráfico de probabilidade normal dos efeitos para avaliação dos fatores e efeitos no procedimento QuEChERS.	68
Figura 17. Gráfico de Pareto de efeitos padronizados para avaliação dos fatores e efeitos no procedimento QuEChERS.	69
Figura 18. Gráfico de probabilidade normal dos efeitos para avaliação dos fatores e efeitos no procedimento DLLME.	69
Figura 19. Gráfico de Pareto para análise dos efeitos lineares principais dos três fatores estudados.	70
Figura 20. Gráfico de Pareto para análise dos efeitos lineares/quadráticos dos três fatores estudados.	71
Figura 21. Efeitos dos fatores volume de solvente extrator e temperatura da centrífuga (com 0,5 g de MgSO_4)	71
Figura 22. Efeitos dos fatores volume de solvente extrator e temperatura da centrífuga (com 1,0 g de MgSO_4)	72
Figura 23. Efeitos dos fatores volume de solvente extrator e temperatura da centrífuga (com 2,0 g de MgSO_4)	72
Figura 24. Gráfico de contorno com os efeitos dos três fatores estudados (1 g MgSO_4)	73
Figura 25. Reta e equação de reta obtidas pela análise de três curvas analíticas de ERI em solução.	75
Figura 26. Representação gráfica das respostas obtidas em função da concentração de ERI no teste de linearidade com os resultados das três curvas analíticas preparadas em matriz.	75
Figura 27. Gráfico de distribuição de resíduos resultante de análise de regressão com os resultados obtidos das três curvas analíticas em matriz.	77
Figura 28 Cromatogramas de matrizes branco (peixes controle) de seis fontes diferentes obtidos no modo MRM na transição de quantificação da ERI.	81
Figura 29. Cromatogramas de (a) diluente, (b) do analito ERI em solução diluente, (c) do analito em matriz fortificada e (d) do analito em extrato fortificado, obtidos no modo MRM na transição de quantificação de ERI.	82
Figura 30. Retas e equações de retas de curvas analíticas em extrato e em solução para avaliação do efeito matriz do método analítico de determinação residual de ERI em carne de pacu.	83
Figura 31. Fotografia dos 8 lotes de ração medicamentosa contendo ERI produzidos em laboratório.	89

Figura 32. Fotografia de ração antes (béquer do lado esquerdo) e após o procedimento de incorporação com gelatina (béquer do lado direito).	89
Figura 33. Gráfico representando o perfil de depleção residual de ERI.....	93
Figura 34. Ampliação do gráfico do perfil residual de ERI para melhor visualização do comportamento da curva em relação às concentrações em torno do LMR ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$).....	93
Figura 35. Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual considerando os resíduos de ERI: Limite Máximo de Resíduo ($\text{LMR} = 100 \mu\text{g kg}^{-1}$; $\text{Ln}_{\text{LMR}} = 4,605$); (a): reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%; $\text{PC}_{95/95}$: Período de Carência estimado com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95% = 151 horas; $\text{PC}_{95/99}$: Período de Carência estimado com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99% = 175 horas.	94
Figura 36. Peixes pacu em uma das caixas d'água em biotério, durante a alimentação com ração medicamentosa.	97
Figura 37 . Peixe em balde contendo solução de benzocaína a $0,2 \text{ g L}^{-1}$ para eutanásia.	98
Figura 38. Realização de pesagem de peixe.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies mais comuns na atividade aquícola por região no país.....	7
Tabela 2. Medicamentos antimicrobianos e antiparasitários com uso aprovado para espécies produzidas na aquicultura no Brasil.....	11
Tabela 3. Fórmulas químicas e massas moleculares da ERI A e de substâncias relacionadas	13
Tabela 4. Valores de LMR para eritromicina em tecidos de animais produtores de alimentos.	15
Tabela 5. Métodos analíticos empregados na determinação residual de ERI em pescados. ...	26
Tabela 6. Configuração do espectrômetro de massas nas transições monitoradas nos métodos de determinação de ERI.	40
Tabela 7. Concentração das soluções utilizadas no preparo da curva analítica em matriz através da fortificação com o ativo e concentrações final de cada ponto da curva.	41
Tabela 8. Planejamento experimental Plackett-Burman de 7 fatores para a etapa QuEChERS	46
Tabela 9. Planejamento experimental Plackett-Burman de 11 fatores para a etapa DLLME.	47
Tabela 10. Planejamento fatorial Composto Central de 3 fatores para o método de extração de ERI de carne de pacu.	48
Tabela 11. Critérios de aceitação para a precisão, conforme concentração do analito na ração.	50
Tabela 12. Faixa de aceitação para o Fator de Recuperação obtido no teste de veracidade, conforme concentração do analito na ração.	52
Tabela 13. Estudo para determinação da especificidade, LD, LQ, precisão e exatidão.	54
Tabela 14. Critérios de aceitação da precisão conforme as concentrações dos analitos.	55
Tabela 15. Critérios de aceitação da exatidão conforme as concentrações dos analitos	55
Tabela 16. Condições avaliadas para estudo da robustez do método analítico para determinação residual de ERI em carne de pacu.	55
Tabela 17. Resultados obtidos para a avaliação da eficiência do método de extração de ERI da ração.	60
Tabela 18. Resultados obtidos nos testes F de Fisher-Snedecor nos níveis de fortificação de ERI avaliados para o estudo de efeito matriz do método analítico em ração de peixe.	62
Tabela 19. Resultados obtidos nos testes t de Student nos níveis de fortificação de ERI avaliados para o estudo de efeito matriz.	62

Tabela 20. Equações de reta e coeficientes de correlação (r) e de determinação (R^2) obtidos em cada uma das três curvas analíticas em matriz para avaliação da linearidade.....	63
Tabela 21. Resultados de repetibilidade e precisão intermediária referentes ao teste de precisão do método analítico para análise de ração contendo ERI.	64
Tabela 22. Resultados do teste de veracidade para o método analítico de ERI em ração	65
Tabela 23. Resultados do teste de robustez para o método de determinação de ERI em ração.	65
Tabela 24. Resultados médios ($n=3$) obtidos pela análise de curvas em matriz e em extrato para cálculo da eficiência de extração.....	74
Tabela 25. Parâmetros das curvas analíticas em solução utilizados para o cálculo da estimativa do LD e LQ.....	74
Tabela 26. Equações de reta e coeficientes de correlação (r) e de determinação (R^2) obtidos em cada uma das três curvas analíticas em matriz para avaliação da linearidade.....	76
Tabela 27. Respostas médias, variâncias, desvios padrão e coeficientes de variação para cada concentração estudada na curva analítica ($n=9$).....	76
Tabela 28. Valores obtidos no teste F de Fisher-Snedecor e valor crítico para avaliação da homocedasticidade.	77
Tabela 29. Resultados obtidos no estudo realizado para determinação de LD, LQ, precisão e exatidão a partir da fortificação de matriz com ERI nos níveis apontados.	78
Tabela 30. Resultados dos testes de exatidão e precisão para o método de determinação de ERI em carne de pacu.	79
Tabela 31. Faixas aceitáveis para a exatidão segundo a concentração do analito.	79
Tabela 32. Coeficientes de variação aceitáveis para o teste de precisão segundo a concentração do analito.	79
Tabela 33. Concentração média, fatores de recuperação e erro relativo obtidos no teste de robustez do método.	80
Tabela 34. Resultados obtidos nos testes F de Fisher-Snedecor nos níveis de fortificação de ERI avaliados para o estudo de efeito matriz do método analítico em carne de pacu.	82
Tabela 35. Resultados observados nos testes t de Student nos níveis de fortificação de ERI avaliados para o estudo de efeito matriz do método analítico em carne de pacu.	83
Tabela 36. Comparação estatística entre os coeficientes angulares de três curvas analíticas em solução e três curvas analíticas em extrato fortificado.	84
Tabela 37. Resultados do teste de estabilidade em matriz de amostras fortificadas com ERI e armazenadas em freezer à -20°C	85

Tabela 38. Resultados do teste de estabilidade da amostra após o processo de extração (n=3).	86
Tabela 39. Concentrações médias (n = 9) das amostras obtidas no teste de eficiência de incorporação.	86
Tabela 40. Resultados do ensaio de lixiviação realizado em triplicata (n = 3).	87
Tabela 41. Peso médio dos peixes e desvio padrão por caixa.	87
Tabela 42. Concentrações médias de ERI (n=3) obtidas nas análises dos lotes de ração medicamentosa produzidos.....	88
Tabela 43. Valores médios diários (n=4), valores médios totais e os respectivos desvios-padrão (n=40) das condições experimentais no estudo com os animais.	90
Tabela 44. Resultados de concentração média (n=2) para os peixes abatidos após períodos pré-estabelecidos e analisados.....	91

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo da resposta instrumental obtida com a utilização de padrão interno.	40
Equação 2. Cálculo do fator de recuperação.	51
Equação 3. Cálculo da correção de recuperação	51
Equação 4. Cálculo do limite de detecção.	53
Equação 5. Cálculo do limite de quantificação.	53
Equação 6. Modelo sugerido para descrever a resposta instrumental.	73
Equação 7. Cálculo do teste C de Cochran.	76
Equação 8. Cálculo do efeito matriz.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAUNESP	Centro de Aquicultura da UNESP
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária no Brasil
CMC	Carboximetilcelulose
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CV	Coeficiente de variação
DAD	<i>Diode Array Detector</i> – detector de arranjo de diodos
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DLLME	<i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i> – microextração líquido-líquido dispersiva
EC	<i>European Commission</i> – Comissão Europeia
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> -ensaio de imunoabsorção enzimática
EMA	<i>The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products</i> – Agência Europeia de Avaliação de medicamentos.
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERI	Eritromicina
ERI-D6	Eritromicina deuterada
ESI	<i>Electrospray ionization</i> – interface de ionização por eletrospray
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura.
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FD	<i>Fluorescence Detector</i> – detector de fluorescência
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> - Agência de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos
FEN	Fenacetina
GC	<i>Gas Chromatography</i> – cromatografia a gás
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> – Cromatografia líquida de alta eficiência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	Ingestão Diária Aceitável
JECFA	<i>The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i> – Comitê Conjunto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares
LC	<i>Liquid Chromatography</i> – cromatografia líquida
LD₅₀	<i>Lethal dose 50%</i> - Dose letal mediana
LD	Limite de detecção
LLE	<i>Liquid-liquid Extraction</i> – extração líquido-líquido
LQ	Limite de quantificação

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> – monitoramento de reações múltiplas
MS	<i>Mass Spectrometry</i> – espectrometria de massas
MSPD	<i>Matrix Solid Phase Dispersion</i> – dispersão da matriz em fase sólida
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
m/z	Razão massa/carga
OIE	<i>World Organisation for Animal Health</i> – Organização Mundial para a Saúde Animal
Peixe BR	Associação Brasileira de Piscicultura
PI	Padrão Interno
PPM	Pesquisa Pecuária Municipal
PSA	<i>Primary Secondary Amine</i> - Amina primária e secundária
QToF	<i>Quadrupole Time of Flight</i> – Quadrupolo tempo de voo
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> – rápido, fácil, baixo custo, eficaz, robusto e seguro.
rpm	Rotações por minuto
SENAR	Serviço Nacional de Aprendizagem Rural
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> – extração em fase sólida
TQ	<i>Triple Quadrupole</i> – triplo quadrupolo
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> – cromatografia líquida de ultra eficiência
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
VICH	<i>International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products</i> – Cooperação Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Registro de Medicamentos Veterinários

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE EQUAÇÕES	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
SUMÁRIO	i
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1 Aquicultura no Brasil.....	7
2.2 Eritromicina.....	12
2.3 Técnicas de preparo de amostra em análise de alimentos	17
2.3.1 QuEChERS.....	19
2.3.2 Técnica de microextração líquido-líquido dispersiva.....	22
2.4 Métodos analíticos voltados à determinação de resíduos de ERI em pescados	25
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Equipamentos, instrumentos e acessórios	34
4.2 Reagentes e solventes	35
4.3 Preparo de soluções padrão	36
4.3.1 Estabilidade das soluções.....	37
4.4 Procedimento de incorporação de ERI na ração	37
4.5 Desenvolvimento de métodos analíticos	39
4.5.1 Configuração do sistema LC-MS/MS para análise de ERI	39
4.5.2 Curvas analíticas	40
4.6 Amostras branco (isentas do analito).....	41
4.6.1 Amostras branco de ração	41
4.6.2 Amostras branco de carne de pacu	42
4.7 Métodos de preparo de amostra	42
4.7.1 Extração de ERI em ração	42

4.7.2 Extração de ERI em carne de pacu	43
4.8 Validação dos métodos analíticos	48
4.8.1 Validação do método para determinação de ERI em ração	48
4.8.2 Validação do método analítico para determinação de resíduos de ERI em carne de peixe.....	52
4.9 Estudo de depleção residual	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 Métodos analíticos	60
5.1.1 Determinação de ERI em ração	60
5.1.2 Validação analítica do método para a determinação de ERI em ração	60
5.1.3 Desenvolvimento do método para a determinação de ERI em carne de pacu	66
5.1.4 Validação do método analítico para determinação residual de ERI em carne de peixe ..	74
5.2 Avaliação do método de incorporação de ERI na ração.....	86
5.3 Estudo de depleção residual	87
5.3.1 Condições experimentais.....	87
5.3.2 Análise das amostras e estimativa do período de carência.....	91
6 CONCLUSÕES	100
7 REFERÊNCIAS	102
8 APÊNDICES	115
9 ANEXOS.....	117

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial para Saúde Animal (*World Organisation for Animal Health*, OIE) estima que ao menos 75% das doenças humanas infecciosas emergentes como Ebola, HIV e influenza possuem origem animal, ameaçando a vida e o bem-estar animal além de colocar em risco a saúde pública. Uma abordagem interdisciplinar, a Saúde Única (*One Health*) considera a saúde humana, a saúde dos animais (domésticos e selvagens) e a saúde dos ecossistemas em que vivemos indissociáveis. Esse ponto de vista demonstra a necessidade da concepção de estratégias de desenvolvimento sustentável e intervenções que considerem a saúde de todos os seres vivos e do meio ambiente como um todo (OIE, 2020).

A proteína de origem animal e os produtos derivados de animais são muito necessários na alimentação humana, contudo cerca de 20% das produções animais são perdidas devido às doenças. A detecção precoce e o controle de doenças são importantes para garantir a saúde e o bem-estar animal, mas também para evitar a introdução de patógenos na cadeia alimentar, contribuindo para a saúde humana e para a segurança alimentar (OIE, 2020).

Entre as atividades produtivas de criação de animais, a aquicultura e o comércio mundial de produtos marinhos e de água doce estão em ritmo de crescimento. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO), a aquicultura mundial cresceu cerca de 5,3% ao ano entre os anos de 2001 e 2018 e apesar de não apresentar o mesmo desenvolvimento como nos anos 80 e 90, o aumento da atividade ainda é maior do que dos outros setores de produção de alimentos (FAO, 2020).

A aquicultura é a atividade de produção de organismos aquáticos, incluindo peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas em um espaço confinado e controlado. Em 2018, a produção global de peixes (piscicultura) alcançou 179 milhões de toneladas, sendo que 82 milhões (46%) foram produzidas pela aquicultura (FAO, 2020). O consumo de peixe também aumentou, entre 1961 e 2017, com média de 3,1%. Contudo, para atender à crescente demanda da população mundial, será necessária uma expansão ainda maior desta atividade e para isso, o desenvolvimento sustentável da aquicultura deverá ser o objetivo principal para se alcançar o potencial dos sistemas de produção e evitar impactos ambientais e socioeconômicos, controlar e prevenir doenças (FAO, 2020; Stentiford, 2020).

Os medicamentos veterinários são frequentemente utilizados em animais produtores de alimentos para manutenção do bem-estar animal, como promotores de crescimento,

imunomoduladores e para evitar perdas na produtividade, prevenindo ou tratando doenças. Quando utilizados na aquicultura, os medicamentos veterinários podem contribuir para a poluição das águas e afetar a segurança da água potável. Ainda, o uso excessivo de medicamentos e o uso de substâncias não permitidas, como é o caso do verde de malaquita, podem levar à poluição ambiental, prejudicando a vida de outros animais, plantas e microrganismos (Hashimoto et al., 2011; Chen et al., 2013; Boobis et al., 2017; Wang; Xie; Lee, 2021). Os resíduos dos medicamentos veterinários podem ser encontrados na forma não alterada ou na forma de metabólitos ou conjugados, mesmo em pequenas quantidades, nos alimentos de origem animal, como ovos, leite e carne, interferindo na segurança alimentar. A presença de resíduos ocasiona potenciais riscos à saúde do consumidor, como reações alérgicas, desequilíbrio do microbioma intestinal, transmissão de bactérias resistentes a antimicrobianos e efeitos tóxicos, teratogênicos e carcinogênicos (Gehring; Baynes; Rivierezh, 2006; Rocca et al., 2017).

A segurança alimentar preocupa cada vez mais os consumidores, as agências regulatórias e os pesquisadores, especialmente pelas crises alimentares que afetam a saúde pública. Os resíduos de antimicrobianos em alimentos são um risco à saúde humana, principalmente porque contribuem para a transmissão de bactérias patogênicas resistentes à antimicrobianos através da cadeia alimentar (Marazuela; Bogialli, 2009). O Centro de Controle de Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (*Center for Disease Control and Prevention*, CDC – EUA) descreve o desenvolvimento de bactérias resistentes a antimicrobianos pelo uso desses medicamentos em animais produtores de alimentos, que acabam infectando o homem por meio da alimentação (CDC, 2013).

Com o objetivo de proteger a saúde do consumidor contra os possíveis riscos associados à presença de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal e assim limitar a exposição humana a essas substâncias, agências regulatórias têm estabelecido Limites Máximos de Resíduos (LMR) para substâncias de uso veterinário em animais destinados à produção de alimentos para consumo humano. O LMR é estabelecido para assegurar a qualidade e a segurança dos produtos de consumo e é definido como a concentração máxima de resíduo tolerável no alimento 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, de forma que não provoque danos à saúde e é determinada com base nas informações toxicológicas disponíveis sobre uma determinada substância na época da avaliação (JECFA, 2007).

Em alimentos, o LMR é estabelecido pelo *Codex Alimentarius*, assessorado pela FAO e pela Organização Mundial de Saúde (OMS), ou pelos órgãos competentes de cada país. O *Codex Alimentarius* é referência mundial para os consumidores, produtores de alimentos, agências regulatórias e para o comércio internacional de alimentos e os padrões estabelecidos são reconhecidos internacionalmente e adequados para a proteção da saúde do consumidor (Paschoal et al., 2008). No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) estabelece os LMR dos princípios ativos a serem monitorados através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Para confirmar a segurança dos produtos de origem animal, análises qualitativas e quantitativas que permitam determinar a presença de medicamentos veterinários e outras substâncias em quantidades mínimas são imprescindíveis. De modo geral, os métodos analíticos devem apresentar elevada sensibilidade e seletividade para determinar com confiabilidade a concentração desses compostos em alimentos (Danezis et al., 2016; Wang; Xie; Lee, 2021). Entre as técnicas analíticas utilizadas para esta finalidade, a cromatografia líquida (LC) associada à espectrometria de massas (MS) é versátil, amplamente aceita e pode ser aplicada em métodos de triagem ou quantitativos. Ainda, a LC associada à MS sequencial (LC-MS/MS) é uma ferramenta importante e capaz de alcançar a sensibilidade exigida pelos limites regulatórios, bem como a seletividade necessária para identificação adequada dos compostos, possibilitando a realização de análises multirresíduos e multiclassas (Tian et al., 2016; Holcapek; Jirásko; Lída, 2012; Hird et al., 2014; Delatour et al, 2018).

Mesmo com o avanço das técnicas analíticas, é fundamental um estudo atento dos procedimentos de preparo de amostra, sobretudo para determinação ao nível de traços de substâncias em matrizes complexas como os alimentos. Componentes indesejados podem ser extraídos da matriz juntamente com o analito de interesse, causando o efeito matriz. Especialmente quando se utiliza a interface de ionização por eletrospray (ESI – *Electrospray Ionization*), o efeito matriz no sistema de detecção pode prejudicar a eficiência da ionização, causando supressão ou incremento do sinal analítico. Com isso, a determinação inequívoca de baixas concentrações do analito pode ser dificultada, comprometendo a performance analítica do método, como os parâmetros sensibilidade, precisão e exatidão (Ridgway; Lalljie; Smith, 2007; Ghosh; Shinde; Chakraborty, 2012; Hird et al., 2014; Danezis et al., 2016; Zhou; Yang; Wang, 2017.).

Numerosos métodos analíticos são desenvolvidos com o objetivo de determinar compostos antimicrobianos em espécies aquícolas, dada a importância da aplicação de

ferramentas analíticas para se garantir a conformidade e a segurança alimentar (Sismotto et al., 2014; Orlando et al., 2016; Busatto et al., 2017; Fais et al. 2017; Guidi et al., 2018; Vardali; Samanidou; Kotzamanis, 2018; Neto et al., 2019). Na aquicultura, os medicamentos antimicrobianos são empregados no tratamento de doenças, como profilaxia e como metafilaxia, que são procedimentos para se tratar um grupo de animais doentes enquanto outros também são medicados como prevenção. Em alguns casos, pode-se utilizar formas de administração como a aplicação tópica, injeções, banhos de imersão ou bioenriquecimento, entretanto, para melhor absorção e efetividade do tratamento antimicrobiano, a administração é frequentemente realizada através de ração medicada, preparada pela incorporação do ativo nos pellets de ração. Muitas doenças infecciosas bacterianas podem ser tratadas via ração medicada, mas ainda é possível haver dificuldades, já que os animais doentes perdem o apetite (Zrnčiči, 2020).

Os riscos provenientes do eventual uso indiscriminado de antimicrobianos no ambiente aquático são preocupantes e podem afetar outras espécies animais, o meio ambiente e a saúde humana. No entanto, sabe-se que esses medicamentos são essenciais para a saúde e o bem estar e animal. O uso responsável e prudente de antimicrobianos deve seguir as boas práticas veterinárias para redução dos riscos e manutenção da eficácia do tratamento, como a detecção e a investigação de doenças, identificação do patógeno, realização de testes de diagnóstico e de susceptibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos, prescrição do tratamento correto, cumprimento da legislação, avaliação da segurança e eficácia dos medicamentos e o monitoramento de resíduos nos produtos de origem animal. (Cabello et al., 2013; Santos; Ramos, 2018; OIE, 2019)

As bactérias estão entre os agentes patogênicos causadores de elevada mortalidade em peixes, podendo provocar perdas recorrentes na produção. Segundo a FAO (2016), a estreptococose é uma infecção bacteriana importante em espécies aquícolas de regiões tropicais causada por bactérias do gênero *Streptococcus*, cujas principais espécies que afetam os peixes são: *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis* e *S. ictaluri*. No Brasil foram identificadas as espécies *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae* e *S. dysgalactiae*. A estreptococose é uma zoonose com ampla distribuição mundial e é capaz de infectar peixes marinhos e de água doce. A transmissão ocorre de forma horizontal, pelo contato entre animais infectados e animais saudáveis e também pela água. A mortalidade é alta na forma aguda da doença, ultrapassando 50%, enquanto na fase crônica pode chegar a 20% em épocas de temperatura elevada (acima de 28°C). Os sinais clínicos são típicos de septicemia bacteriana,

em geral os peixes apresentam natação errática (em círculos), perda de equilíbrio na água e pode-se observar o escurecimento do corpo, lesões semelhantes a abscessos na pele e nos músculos, olhos opacos ou esbranquiçados, podendo apresentar exoftalmia (olhos “saltados”), ascite e hemorragias difusas pelo corpo do animal (CNA; MAPA, 2020).

Entre os antimicrobianos, os macrolídeos são uma classe bem estabelecida, possuem grande aplicabilidade clínica na medicina humana e veterinária. São compostos inibidores da síntese de proteínas, com grande afinidade pelos ribossomos bacterianos, o que é consistente com o seu amplo espectro de atividade (Kirst, 2002; Dinos, 2017). A eritromicina (ERI) é o macrolídeo mais conhecido e estudado, mas ainda não é regulamentada para uso na aquicultura no Brasil, onde apenas dois antimicrobianos são de uso permitido. Na medicina veterinária, este ativo é amplamente utilizado para o tratamento de doenças respiratórias e infecções entéricas em gado, ovelhas e suínos (Draisci et al., 2001). Na aquicultura, a ERI é empregada em alguns países produtores como Chile, Vietnam, Coreia do Sul, Bangladesh e Japão, sobretudo para o tratamento de doença renal bacteriana e estreptococose (Rico et al., 2012; De Alwis et al., 2013; Lozano et al., 2018; Chen et al., 2020).

Considerando o grande potencial da ERI no controle de patógenos bacterianos que afetam várias espécies aquícolas, sua avaliação quanto ao emprego na aquicultura é importante e para isso, faz-se necessário estudar a presença de resíduos de ERI após a administração oral do ativo. O grande desafio é conseguir determinar com precisão e exatidão níveis de concentração abaixo do LMR, para que seja possível avaliar o perfil de eliminação e estimar um período de carência mínimo a ser recomendado. Diante disto, a proposta visava fornecer dados relacionados ao uso seguro deste medicamento em peixe de importância comercial para o Brasil, considerando aspectos de segurança alimentar e ambiental. Para tanto, um método de incorporação do ativo na ração foi desenvolvido e avaliado para se ter uma condição viável de administração aos animais. Também foi desenvolvido e validado um método analítico para determinação residual de ERI em carne de peixe por LC-MS/MS utilizando uma associação de técnicas modernas de preparo de amostras, o procedimento QuEChERS e a DLLME.

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aquicultura no Brasil

Com condições extremamente favoráveis para a aquicultura, o Brasil já foi considerado o país com maior potencial para o desenvolvimento desta atividade e hoje ocupa a 13ª posição entre os países produtores de peixes em cativeiro (FAO, 2020). A disponibilidade de recursos hídricos, como a extensa costa marítima e os reservatórios de água doce, o clima favorável, mão de obra acessível e a demanda interna são fatores significativos para impulsionar a prática da aquicultura sustentável no país (EMBRAPA, 2017). Todos os estados brasileiros contribuem com a produção aquícola e as espécies mais produzidas em cada região no ano de 2017 estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 Espécies mais comuns na atividade aquícola por região no país.

Região	Espécies mais produzidas
Norte	Tambaqui, pirarucu e pirapitinga
Nordeste	Tilápia e camarão
Centro-oeste	Tambaqui, pacu e pintado
Sudeste	Tilápia, pacu e pintado
Sul	Carpa, tilápia, ostra e mexilhão

Fonte: EMBRAPA. Pesca e Aquicultura, 2017.

Em 2019 produziu-se cerca de 758 mil toneladas de peixes no país, um crescimento de 4,9% em relação ao ano anterior. A produção de espécies de peixes nativos, liderada pelo Tambaqui, representa 38% do total e atingiu 287 mil toneladas em 2019. Os maiores produtores de peixes nativos foram os estados de Rondônia, Mato Grosso e Maranhão. Outras espécies como carpas, truta e patinga também avançaram, apesar da oferta ainda ser pequena. A produção foi liderada pelo Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (PeixeBR, 2020). O gráfico da Figura 1 apresenta dados do IBGE, da Pesquisa Pecuária Municipal (PPM), sobre as espécies produzidas pela piscicultura brasileira em 2018.

Figura 1. Produção da piscicultura brasileira por espécie, em toneladas, no ano de 2018. Fonte: IBGE/PPM, 2019.

Em 2018 a tilápia representou cerca de 60% de toda a produção da piscicultura, enquanto que o tambaqui 20% e tambacu/tambatinga 8% (EMBRAPA, 2020). As espécies nativas possuem grande potencial produtivo e econômico, mas para melhor estruturação da produção ainda faltam informações científicas e tecnológicas, o que representa um grande desafio para o setor. Entre os peixes nativos, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), também conhecido como caranha, é um peixe redondo, de água doce e hábito onívoro. A espécie é nativa da bacia dos Rios Paraná Paraguai e Uruguai, mas se adaptou ao cativeiro e é bem aceito pelos consumidores (Lima, Mujica, 2012). É uma espécie promissora na piscicultura brasileira, pois apresenta crescimento rápido, fácil adaptação à alimentação artificial e rusticidade no manejo, permitindo a criação intensiva (Cantelmo, 1993).

Os peixes de cultivo no país também são relevantes para a segurança alimentar, visto que constituem importante fonte de proteína na agricultura familiar. A Tilápia e o Tambaqui são as espécies mais importantes na piscicultura, sendo que a Tilápia é a mais produzida no país. Em 2019 sua produção alcançou 432 mil toneladas, representando 57% da produção nacional, consolidando o Brasil como o 4º maior produtor mundial de Tilápia. Os estados Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Santa Catarina são os grandes produtores da espécie (PeixeBR, 2020).

Segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), no país o consumo de pescados ainda é menor que 10 kg por ano por habitante, média menor do que para as outras proteínas animais e menor do que o valor recomendado pela FAO/OMS, correspondente a 12 kg por ano por habitante. Apenas 1/3 do consumo atual é de peixes cultivados no Brasil e o segmento representa menos de 2% das vendas totais. A tilápia é a espécie mais consumida, presente em todo o país, enquanto que o tambaqui, pacu, tambacu, pirapitinga e tambatinga são pouco presentes. A cultura de consumo do brasileiro é mais afeita às carnes de gado, frango e suíno, por isso instituições públicas têm trabalhado em parceria para estabelecer estratégias voltadas ao estímulo do aumento de consumo de peixe. Enquanto isso, o volume médio de consumo mundial é de 20 kg por habitante ao ano (PeixeBR, 2019).

As exportações da piscicultura e subprodutos (peles, escamas, óleos, gorduras e farinhas) são o segundo segmento mais importante na exportação de pescados. Em 2019, as exportações brasileiras da piscicultura alcançaram aproximadamente 6500 toneladas, o que representou um aumento de 26% em relação ao ano de 2018 (PeixeBR, 2020). No primeiro semestre de 2020, o aumento foi de 33% em relação ao mesmo período em 2019. Entre as

espécies exportadas, a tilápia manteve o destaque, correspondendo a 86% das exportações da piscicultura (EMBRAPA, 2020).

Com o gerenciamento e conservação dos recursos naturais necessários para produzir organismos aquáticos, é possível o desenvolvimento da aquicultura sustentável, com benefícios sociais e lucro, mas preservando o meio ambiente. Ao implantar boas práticas de manejo, é possível melhorar os sistemas de produção de animais aquáticos e reduzir o impacto ambiental (Valenti, 2002). Visando garantir a sustentabilidade em aquicultura, assegurar a prevenção e o controle de doenças e dessa forma contribuir para o aumento da produtividade e da oferta de pescado, bem como a sanidade dos cultivos nacionais, foi criado o Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos de Cultivo (MAPA, 2017).

Atualmente um dos grandes desafios da aquicultura brasileira está relacionado aos temas de sanidade e biossegurança (EMBRAPA). Os sistemas intensivos de criação animal são ambientes favoráveis à disseminação de doenças, o que é mais preocupante no ambiente aquático, contendo alta densidade populacional. Mudanças físico-químicas neste ambiente ou o manejo inadequado também podem afetar diretamente a saúde dos animais (Kubitza, 2012; Quesada; Paschoal; Reyes, 2013). Os principais patógenos responsáveis por elevada mortalidade em peixes são vírus e bactérias, posto que alguns são capazes de causar perdas recorrentes, inviabilizando a produção. No entanto, observa-se uma limitação quanto aos medicamentos com o uso permitido em produção de animais aquáticos no Brasil. Várias doenças infecciosas podem acometer os animais e para evitar o surgimento e a disseminação, muitos produtores são conduzidos a um cenário favorável ao emprego irregular de fármacos e outras substâncias (Chen et al., 2013). Na aquicultura brasileira há registros de surtos com grandes perdas e impacto econômico causados por bactérias do gênero *Streptococcus* (Assis et al., 2017; Salvador et al., 2005; Sebastião, 2015).

De acordo com o Compêndio de Produtos Veterinários do SINDAN (2021), 28 produtos veterinários estão registrados para o uso em peixes (considerando peixes ornamentais). Entre estes produtos, são incluídos vitaminas e minerais, hormônios, inseticidas de uso veterinário e promotores de crescimento. Para as espécies aquícolas, apenas dois medicamentos antimicrobianos e um antiparasitário são regulamentados para uso no país, destinados ao controle de doenças infecciosas para animais produzidos na aquicultura, como apresentado na Tabela 2. Existe também uma vacina indicada para imunização ativa de tilápias, para redução da estreptococose causada por *Streptococcus agalactiae*. A instrução normativa número 26 do MAPA, de 9 de julho de 2009 que trata da fabricação, do controle de qualidade, a

comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário, veda o uso de anfenicóis, tetraciclinas, beta lactâmicos, quinolonas e sulfonamidas como aditivos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais (MAPA, 2009).

Tabela 2 Medicamentos antimicrobianos e antiparasitários com uso aprovado para espécies produzidas na aquicultura no Brasil.

Medicamento	Classe	Indicação	Espécies	Período de carência
Florfenicol	Antimicrobiano	Estreptococoses (<i>Streptococcus agalactiae</i>) e septicemias hemorrágicas causadas por <i>Aeromonas</i> móveis (<i>Aeromonas</i> spp.).	Tilápias e seus híbridos	14 dias
		Doença da boca vermelha (<i>Yersinia ruckeri</i>)	Truta arco-íris	Depende da temperatura.
Triclorfone ou Metrifonato	Antiparasitário	Combate de ectoparasitas de peixes água doce, como piolho de peixe (<i>Argulus</i> sp.), verme das brânquias (<i>Dactylogyrus</i> sp.), verme da âncora (<i>Lernea</i> sp.), entre outros.	Truta, carpas e enguias	21 dias
Oxitetraciclina	Antimicrobiano	Doença ulcerosa, (<i>Haemophilus piscium</i>), Furunculose (<i>Aeromonas salmonicida</i>), septicemia hemorrágica (<i>Aeromonas liquefaciens</i>) e doenças causadas por <i>Pseudomonas</i> .	Salmonídeos	21 dias
		Infecções causadas por <i>Aerococcus viridans</i> .	Crustáceos e lagostas	30 dias
		Septicemia hemorrágica (<i>Aeromonas liquefaciens</i>) e doenças causadas por <i>Pseudomonas</i> .	Bagres	21 dias

Fonte: SINDAN, 2021.

Decorrente do desafio que a maior parte dos produtores enfrentam em cumprir à risca as boas práticas de produção animal, além de muitas vezes não possuir estrutura que permita o manejo adequado dos peixes, produtos veterinários, dentre os quais estão os medicamentos, são usados frequentemente como forma de compensação. Com a dificuldade do diagnóstico precoce de doenças, o cenário favorece o uso indiscriminado de medicamentos veterinários, de modo que a saúde dos peixes, de outros organismos e do trabalhador pode ser prejudicada de modo que o custo da produção aumenta (Kubitza, 2009).

2.2 Eritromicina

A eritromicina (ERI) é o membro mais representativo entre os antimicrobianos macrolídeos e o primeiro a ser utilizado na medicina. É produzida naturalmente por algumas cepas de *Streptomyces erythreus*, de onde foi isolada em 1952 (Habibi et al., 2017). Utilizados há mais de seis décadas, os macrolídeos são classificados conforme o número de átomos que formam o anel lactônico, que pode ter de 12 a 16 membros. O mecanismo de ação destes antimicrobianos envolve a inibição da multiplicação das células bacterianas, que ocorre através da ligação à subunidade 50S do ribossomo procariótico, causando interferência na síntese proteica. As moléculas são majoritariamente bacteriostáticas, mas em elevadas concentrações podem apresentar atividade bactericida em cepas mais suscetíveis. (Vázquez-Laslop; Mankin, 2018; Dinos, 2017; Liu et al. 2014).

Os antimicrobianos macrolídeos são indicados clinicamente para o tratamento de infecções por *Mycoplasma pneumoniae*, infecções respiratórias causadas por *Streptococcus* e *Staphylococcus*, difteria, gastroenterites causadas por *Campylobacter jejuni*, uretrite e cervicite associada à *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* ou *Ureaplasma urelyticum* (Anadón; Reeve-Johnson, 1999). O primeiro macrolídeo utilizado na medicina veterinária para animais de produção foi a espiramicina, no início dos anos 60, seguida pela eritromicina e tilosina, no início dos anos 70 (Prescott, 2006).

A ERI é ativa principalmente contra cocos gram-positivos como estafilococos, estreptococos e diplococos e também contra algumas bactérias gram-negativas (Liu et al., 2014; Dinos, 2017). É amplamente utilizada no tratamento de infecções nas vias aéreas inferiores e superiores e em infecções de pele em humanos e animais e é um dos antimicrobianos de escolha para o controle de *Streptococcus* spp, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sorbia* e *Pseudomonas fluorescens*. (Jones; Voulvoulis; Lester, 2002; Minh; Lam; Trang, 2010; Phuoc et al., 2010).

O processo de fermentação utilizado na produção comercial de ERI não é completamente seletivo e resulta na produção de pequenas quantidades de substâncias relacionadas, as eritromicinas B, C, D, E e F, além da ERI A, que é o componente ativo majoritário e marcador de resíduo (Minh; Lam; Trang, 2010; EMA, 2000). Na Tabela 3 estão apresentadas as fórmulas químicas e as massas moleculares das eritromicinas. Além das substâncias relacionadas, podem estar presentes o metabólito desmetileritromicina e produtos de degradação ácida e básica, eritromicina enol éter, anidroeritromicina, eritrolosamina, pseudoeritromicina A hemicetal, pseudoeritromicina A enol éter e desidroeritromicina. Outras

substâncias relacionadas como a eritromicina A n-óxido, eritromicina oxima e eritromicilamina também podem ser encontradas em produtos comerciais e são estruturalmente muito semelhantes (Minh; Lam; Trang, 2010).

Tabela 3. Fórmulas químicas e massas moleculares da ERI A e de substâncias relacionadas

Eritromicina	Fórmula química	Massa molar (g mol ⁻¹)
A	C ₃₇ H ₅₇ NO ₁₃	734
B	C ₃₇ H ₅₇ NO ₁₂	718
C	C ₃₈ H ₅₅ NO ₁₃	720
D	C ₃₆ H ₆₅ NO ₁₂	704
E	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	748
F	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₄	750

A molécula da eritromicina A (ERI) consiste de uma polihidroxilactona com dois açúcares (Figura 2). A parte aglicona é um anel de lactona com 14 membros, chamado eritranolídeo. Na posição do carbono 5 do anel, a desosamina, um amino açúcar, está unida por um ligação β -glicosídica e sua amina terciária confere um caráter básico à molécula (pK_a 8,8). O outro açúcar é a cladinose, também unido por uma ligação β -glicosídica na posição do carbono 3 do anel.

Figura 2 . Estrutura química da Eritromicina A.

A ERI é uma base fraca, lipofílica e seu coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) é igual a 3,06 (Jones; Voulvoulis; Lester, 2002). A solubilidade em água é de 2 mg mL⁻¹, é livremente solúvel em acetona, acetonitrila, etanol (50 mg mL⁻¹), éter etílico e clorofórmio. As soluções preparadas devem ser protegidas da luz e armazenadas sob refrigeração.

A estabilidade da ERI é dependente do pH, cujos valores ótimos são entre 7 e 8. Em meios levemente ácidos, ocorre a degradação do ativo e conversão para eritromicina-enol-eter.

Em meio fortemente ácido, a ERI é convertida a eritromicina-enol-eter e anidro-eritromicina A. Em pH próximo a 7, a ERI é transformada em pseudo-eritromicina A enol éter, o único composto ativo entre os produtos de degradação formados (Brisaert; Heylen; Plaizier-Verecammen, 1996; Kim et al., 2004).

Em humanos, a absorção oral é menor do que 50% pois a ERI é degradada pelo ácido gástrico e absorvida apenas no intestino. O fígado metaboliza a maior parte da ERI administrada através do citocromo P450, onde ocorre desmetilação, enquanto uma pequena parte é excretada pelos rins (EMA, 2000; Farzam; Nessel; Quick, 2020). Estudos de toxicidade aguda em diferentes animais por diferentes vias de administração determinaram que o LD₅₀ foi maior do que 300 mg kg⁻¹ PV após administração oral do ativo e próximo a 400 mg kg⁻¹ PV após administração intraperitoneal. Estudos de toxicidade de dose repetida relataram mortalidade após ingestão de ERI a 800 mg kg⁻¹ PV por 6 semanas. No entanto, não houveram efeitos adversos após administração oral de doses de 100 e 200 mg kg⁻¹ PV por dia, durante 31 dias em coelhos. Também não houve diferença significativa em estudos de fertilidade, bem como malformação ou efeitos teratogênicos em ratos (EMA, 2000).

Alguns estudos demonstraram efeitos toxicológicos da ERI em peixes, como estresse oxidativo e genotoxicidade (Ji et al., 2012; Rodrigues et al., 2016) e alterações em enzimas antioxidantes (Liu et al., 2017). Recentemente também foram avaliados efeitos histopatológicos após as exposições aguda e crônica à ERI em peixes juvenis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em banho de imersão, estudo conduzido para simular a exposição ambiental ao antimicrobiano. Foram observados danos teciduais progressivos nas brânquias, após as exposições aguda e crônica. Alterações circulatórias como aneurismas e edemas e outras alterações epiteliais, assim como alterações hepatocelulares foram observadas após a exposição aguda. Em comparação a animais controle, a maioria das alterações encontradas apresentaram severidade mínima ou moderada e reversibilidade. Neste estudo, a toxicidade da ERI esteve diretamente relacionada com a concentração do ativo, que variou entre 1,0 e 10000 µg L⁻¹ durante 96 horas nos ensaios de exposição aguda e entre 0,05 e 0,08 µg L⁻¹ durante 28 dias nos ensaios de exposição crônica (Rodrigues et al., 2019a,b). A hepatotoxicidade da ERI e de outros sete macrolídeos foi avaliada em zebrafish. Li; Zhang (2020) demonstraram que os compostos induziram uma degeneração do fígado, com alterações de tamanho do órgão e esteatose hepática, o que sugere que os macrolídeos estudados podem induzir hepatotoxicidade em zebrafish.

O uso de ERI em animais produtores de alimentos ocorre principalmente nos casos de infecções por bactérias do tipo cocos gram-positivos. Na aquicultura, o antimicrobiano é utilizado no controle de *Lactococcus garvieae*, causador de lactococose, que afeta principalmente trutas arco-íris; *Renibacterium salmoninarum*, causador da doença renal bacteriana, que acomete salmonídeos; no tratamento de doenças de peixes pré-reprodutivos e de infecções causadas por *Streptococcus spp.* Em países europeus e nos Estados Unidos, onde seu uso não é regulamentado, a ERI geralmente é prescrita para uso extra-label (Eldar; Ghittino, 1999; Vendrell et al., 2006; Esposito et al., 2007; Serdoz et al., 2011; Lulijwa; Rupia; Alfaro, 2020). Agências regulatórias como a ANVISA (Brasil, 2019b), a EMA (2000), FDA (2020), Codex Alimentarius (2015), JECFA (2015), *Health Canada* (2018) e pela Fundação de Pesquisa Química de Alimentos do Japão (*The Japan Food Chemical Research Foundation*, 2017) estabeleceram valores de LMR para ERI em diferentes tecidos e animais produtores de alimentos, como apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de LMR para eritromicina em tecidos de animais produtores de alimentos.

Agência regulatória	Marcador de resíduo	Tecido	Animais	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
ANVISA	Eritromicina A	músculo	bovinos e suínos	500
		ovos	aves	150
		leite	bovinos e ovinos	200
		fígado e gordura	bovinos, suínos e ovinos	2000
		músculo, fígado, rim, gordura e pele	frango	100
		músculo e pele	peixes	100
EMA	Eritromicina A	músculo	bovinos, suínos e frangos	200
		ovos	aves	250
		leite	bovinos e ovinos	40
Codex Alimentarius	Eritromicina A	músculo, fígado, rim, gordura	frango e peru	100
		ovos	frango	50
FDA	Eritromicina	tecidos consumíveis	bovinos	100
		leite	bovinos	0
		tecidos consumíveis	frango e peru	125
		ovos	frango	25
JECFA (FAO/WHO)	Eritromicina A	músculo, fígado, rim, gordura e pele	frango e peru	100
		ovos	aves	50

Tabela 4. Continuação. Valores de LMR para eritromicina em tecidos de animais produtores de alimentos.

Agência regulatória	Marcador de resíduo	Tecido	Animais	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Health Canada	Eritromicina	músculo, fígado, rim e gordura	Bovinos	100
		músculo, fígado, rim, pele e gordura	frango e peru	125
		músculo, fígado, rim e gordura	Ovinos	200
		leite	Bovinos	50
The Japan Food Chemical Research Foundation	Eritromicina A	músculo, fígado, rim, gordura e miudezas	bovinos, suínos e outros mamíferos terrestres	200
		músculo, fígado, rim, gordura e miudezas	frangos e outras aves	100
		leite		40
		ovos	frango e outras aves	50
		músculo e pele	peixes perciformes	60

Os LMRs diferem entre os países, como por exemplo, no Japão o limite estabelecido para peixes perciformes é de $60 \mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto no Brasil, o LMR para tecido de músculo e pele (em proporções naturais) de peixes é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Embora o antimicrobiano ainda não esteja aprovado para o uso na aquicultura, seu LMR foi estabelecido pela ANVISA conforme a Resolução número 328, de 19 de dezembro de 2019 (Brasil, 2019a) que dispõe sobre a avaliação do risco à saúde humana de medicamentos veterinários e os métodos de análise e conforme a instrução normativa número 51, de 19 de dezembro de 2019, que estabelece a lista de LMR, IDA e dose de referência aguda para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (Brasil, 2019b). Em 2002, a EMA (*European Medicines Agency* – Agência Europeia de Medicamentos) adotou a extensão dos LMRs para ERI a todas as espécies de animais produtoras de alimentos, conforme recomendado pelo Comitê de Medicamentos Veterinários. O LMR para ERI em músculo e pele de peixes neste caso é de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$, valor estimado para que a ingestão pelo consumidor não exceda 90% da IDA (EMA, 2002). Os valores de IDA determinada por estudos toxicológicos para este antimicrobiano estão entre 0 e $0,7 \mu\text{g (kg PV)}^{-1}$ (JECFA, 2006). Algumas agências regulatórias ainda não determinaram o LMR para ERI em pescados, no entanto, esta substância é frequentemente encontrada em peixes em diversos países, provavelmente devido ao uso extra-label. (Serdoz et al., 2011; Griboff et al., 2020).

2.3 Técnicas de preparo de amostra em análise de alimentos

O preparo de amostra é uma etapa envolvida no procedimento analítico que visa a extração, o isolamento e a concentração dos analitos de uma amostra. Este processo é importante para tornar a amostra mais apropriada para a análise química em sistemas analíticos, que, em sua maioria, não são capazes de analisar uma amostra diretamente. Portanto, os procedimentos de preparo de amostra são essenciais para a confiabilidade do método e podem interferir nas etapas seguintes do procedimento analítico (Borges; Pereira; Mano, 2015).

Para verificar a conformidade de alimentos a nível de traços, como na determinação residual de medicamentos veterinários em produtos de origem animal, métodos eficientes e confiáveis são necessários para identificação inequívoca e quantificação dos analitos. Técnicas apropriadas para o preparo de amostra que removam de forma hábil as substâncias interferentes (limpeza do extrato ou *clean up*), tornando a amostra mais adequada para a separação e a detecção, também fornecem resultados mais precisos, exatos, robustos, reproduzíveis e seletivos (Kinsella et al., 2009; Berendsen et al., 2013; Borges; Pereira; Mano, 2015; ROSSI et al., 2017; Korte; Oberleitner; Brockmeyer, 2019).

A escolha da técnica de preparo de amostra é baseada principalmente nas propriedades físico-químicas dos analitos (polaridade, solubilidade, estabilidade, coeficiente de partição, lipofilicidade, pKa, entre outros) e na natureza e composição dos demais constituintes da amostra, que são os interferentes e a matriz. Além disso, são importantes o conhecimento ou estimativa da concentração dos analitos na amostra e as características e compatibilidade do sistema analítico que será utilizado (Ridgway; Lalljie; Smith, 2007; Borges; Pereira; Mano, 2015). Em geral, os alimentos são matrizes que contêm lipídios, carboidratos e proteínas, tornando necessário o uso de procedimentos para desproteínação e remoção de lipídios e açúcares (Sismotto; Paschoal; Reyes, 2013).

Entre as técnicas de preparo de amostra utilizadas na análise de alimentos, a extração líquido-líquido (*Liquid-liquid Extraction*, LLE) é uma técnica clássica e é aplicada a amostras líquidas ou amostras sólidas dissolvidas em solvente adequado. Na LLE a transferência do analito ocorre pela distribuição ou partição deste analito entre dois líquidos imiscíveis. Em um funil de separação, um solvente é adicionado à amostra e a mistura é agitada. Em instantes, equilíbrio é atingido e as duas camadas se separam, neste momento é possível coletar a fração de interesse, que contém o analito. É uma técnica simples e robusta, que pode ser aplicada na

análise de alimentos. No entanto, alguns dos problemas decorrentes da técnica estão relacionados a formação de emulsão em amostras mais gordurosas, podendo ser necessária a adição de sais; a adsorção de analitos em amostras com material particulado; e o alto consumo de solventes e de tempo (Zhang et al., 2012; Barth et al., 2015.).

As técnicas de extração em fase sólida também são aplicadas na análise de alimentos. A extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE) foi desenvolvida nos anos 70 como uma alternativa a LLE e hoje ainda é amplamente utilizada para análise de amostras líquidas e fluidas e pode ser empregada em análise de alimentos, para separação, purificação e enriquecimento. É uma técnica de separação líquido-sólido com vantagens em relação à LLE, como menor consumo de solvente orgânico, capacidade de se obter altas porcentagens de recuperação do analito e possibilidade de pré-concentrar o analito. Para o procedimento, são utilizados cartuchos preenchidos com uma fase sólida de sorvente apropriado, no qual a amostra é introduzida e ocorre a retenção do analito. Na etapa de limpeza, um solvente é eluído para remoção dos interferentes da matriz e em seguida o analito é eluído com solvente adequado e coletado. Pode ser adicionada uma etapa de secagem da amostra coletada para pré-concentração das substâncias de interesse. De maneira geral, os procedimentos de SPE são demorados, ainda utilizam grandes volumes de solvente e os cartuchos empregados na técnica não são de baixo custo (Jardim, 2015; Ötles; Kartal, 2016; Li et al., 2020).

A técnica de dispersão em fase sólida (*Matrix Solid Phase Dispersion*, MSPD) permite a extração de compostos orgânicos em amostras sólidas, semissólidas e líquidas de alta viscosidade. A técnica consiste basicamente em homogeneizar manualmente a amostra a um suporte sólido adsorvente (dispersante), de forma que a amostra esteja dispersa no suporte. O analito interage com o suporte adsorvente pelo processo de sorção, ocorrendo um grande número de interações entre o analito, a matriz e o suporte. O material é transferido para uma coluna, contendo lã de vidro ou papel filtro onde um eluente é adicionado para realizar a dessorção do analito e assim solubiliza-lo e retira-lo da coluna. A técnica permite a homogeneização da amostra, ruptura celular, fracionamento e limpeza, mas uma das limitações da técnica está relacionada à baixa reprodutibilidade (Li et al., 2020).

Avanços recentes têm sido alcançados a partir de modificações e variações desenvolvidas nos procedimentos, visando a redução da poluição ambiental (*Green Analytical Techniques* – Técnicas Analíticas Verdes) e a resolução de desafios encontrados na análise de matrizes de alta complexidade. Uma das tendências atuais é a miniaturização de técnicas de preparo de amostra, que envolve métodos de extração mais ecológicos e que aumentem a

sensibilidade e seletividade de forma sustentável, como uma alternativa aos procedimentos clássicos. As técnicas miniaturizadas utilizam menor quantidade de amostra e de solventes e apresentam maior potencial para automação (Armenta; Garrigues; De La Guardia, 2008; Barth et al., 2015; Santana-Mayor et al., 2019)

2.3.1. QuEChERS

O QuEChERS, acrônimo para *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (rápido, fácil, baixo custo, efetivo, robusto e seguro) é um procedimento moderno e simples de preparo de amostra e que está relacionado aos princípios da Química Analítica Verde (*Green Analytical Chemistry*). Desenvolvido por Anastassiades et al. (2003), o QuEChERS foi proposto para análise de agrotóxicos de diferentes polaridades em amostras de frutas e vegetais, mas rapidamente foi adotado para uma variedade de compostos em diferentes matrizes e atualmente é um dos métodos mais utilizados na determinação de resíduos em alimentos, como agrotóxicos e medicamentos veterinários (Lombardo-Agüi et al., 2012; Kang et al., 2014; Rúbies et al., 2015; Perestrelo et al., 2019; Zhang et al., 2019).

Foram realizadas buscas em base de dados, em abril de 2021, com a palavra-chave “QuEChERS”. As buscas resultaram em mais de 33000 documentos na base de dados *Google Scholar*, 3400 documentos na *Web of Science* (busca por tópico) e 3100 documentos na *Scopus* (busca por título, resumo e palavra-chave). Ao analisar os documentos encontrados na plataforma *Web of Science*, 1240 registros (cerca de 35%) foram categorizados na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, sugerindo um grande valor do emprego do método nesta área. A identificação de registros de diferentes áreas categorizadas pela plataforma, por exemplo, Química Analítica (42%), Ciências Ambientais (15%), Toxicologia (9%), Nutrição (7%) e Agricultura multidisciplinar (6%) demonstra a versatilidade do método, que permite modificações e adaptações a diferentes matrizes, analitos e sistemas analíticos. No período de 2010 à 2020, foram encontrados mais de 3200 registros do tópico QuEChERS na *Web of Science*, como apresentado na Figura 3. Em 2021, já são mais de 150 documentos, indicando que desde a publicação do método, sua aplicação tem sido bastante explorada até hoje.

Figura 3. Gráfico do número de registros encontrados na busca pelo tópico QuEChERS na base de dados Web of Science entre os anos 2010 e 2020.

O procedimento é dividido em três etapas principais que envolvem a extração com solvente, a partição por adição de sais e a limpeza do extrato utilizando extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*, d-SPE). O método proposto originalmente está representado na Figura 4.

Figura 4. Representação do procedimento QuEChERS original. Fonte: adaptado de Zanella et al., 2015a.

No procedimento original, a acetonitrila é utilizada como solvente extrator pois possibilita a extração de uma variedade maior de compostos, enquanto extrai menor quantidade de interferentes, como ceras e gorduras, e também é compatível com os sistemas GC (*Gas Chromatography* – Cromatografia a gás) e LC-MS/MS (Maštovská; Lehotay, 2004). A adição de sais na etapa de partição, como o cloreto de sódio (NaCl), promove o efeito *salting out*, que diminui a solubilidade de compostos polares na fase aquosa, o que pode ser conveniente dependendo do solvente utilizado. Com o uso de acetonitrila, a adição de sais facilita a separação das fases e é realizada de forma fácil e rápida, a baixo custo. O sulfato de magnésio anidro (MgSO₄) é um sal secante e é adicionado para remover a água e assim aumentar a recuperação de compostos polares, além de aquecer a amostra a aproximadamente 40°C durante o processo de hidratação, o que favorece a extração de compostos apolares (Anastassiades et al., 2003). Na etapa de limpeza do extrato, é empregada a d-SPE, procedimento desenvolvido com o QuEChERS, que é baseado na adição de sorventes apropriados em um meio líquido que contém a amostra, seguido de um processo de dispersão. A dispersão favorece o contato entre os sorventes e as substâncias presentes na amostra, que ficam retidas na superfície dos sorventes. Esta técnica pode ser aplicada na remoção dos analitos ou dos interferentes de uma amostra (Islas et al., 2017). O sorvente etilenodiamino-N-propilsilano, PSA (*Primary Secondary Amine* – Amina Primária Secundária) possui afinidade com compostos da matriz e funciona como um trocador iônico, retendo ácidos graxos e outros compostos polares. Outros sorventes podem ser utilizados, conforme a matriz e as substâncias de interesse, como o octadecilsilano (C₁₈) que é mais efetivo na remoção de amostras que contêm gorduras e o carbono grafitizado (*graphitized carbono black*, GCB), que atua na redução de pigmentos provenientes de amostras vegetais (Zanella et al., 2015a).

Além do método original, duas outras versões foram propostas com o objetivo de tamponar os extratos para aumentar a estabilidade de analitos sensíveis a pH ácido ou alcalino. O “QuEChERS acetato” utiliza acetonitrila com 1% de ácido acético e na etapa de partição é adicionado acetato de sódio, conferindo efeito tamponante em pH próximo a 4,8 (Lehotay; Mastovská; Lightfield, 2005). O “QuEChERS citrato” utiliza citrato de sódio di-hidratado e hidrogenocitrato sesqui-hidratado, adicionados na etapa de partição, conferindo efeito tamponante em pH 5,0-5,5 (Zanella et al., 2015a). Outras modificações foram propostas para melhorar a extração de resíduos e contaminantes em matrizes de alimentos de origem animal e vegetal e matrizes ambientais, devido à grande versatilidade do método. O QuEChERS é uma das abordagens mais utilizadas em análises de determinação de resíduos de medicamentos

veterinários em alimentos (Zanella, et al., 2015a; Guo et al., 2016; González-Curbelo, 2015; Chen; Wei; Cao, 2019).

2.3.2 Técnica de microextração líquido-líquido dispersiva

A microextração líquido-líquido dispersiva (*Dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) é uma técnica analítica moderna que foi desenvolvida por Rezaee et al., (2006), com o intuito de analisar compostos orgânicos em água. Na DLLME a extração ocorre de forma semelhante à LLE, onde a mistura do solvente orgânico e da amostra aquosa forma bolhas ou gotas que aumentam a superfície de contato entre as fases e facilitam a partição dos analitos. No entanto, na LLE clássica, a mistura dos solventes geralmente é realizada por agitação e para aumento da eficiência, são necessárias etapas sucessivas de extração, o que torna a LLE uma técnica mais custosa em termos de tempo e de uso de solventes.

O interesse na DLLME cresceu rapidamente desde a introdução da técnica em 2006. Ao pesquisar pela palavra-chave “DLLME”, mais de 12000 resultados foram encontrados na *Google Scholar*, mais de 1900 na *Scopus* (busca por título, resumo e palavra-chave) e mais de 1800 na *Web of Science* (busca por tópico), em abril de 2021. Na plataforma Web of Science, os resultados foram analisados e cerca de 18% dos registros encontrados estão classificados na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, e a maioria (cerca de 62%) na área de Química Analítica. Entre os anos de 2010 e 2020, foram encontrados mais de 1600 registros do tópico DLLME na *Web of Science*, como mostra a Figura 5.

Figura 5. Gráfico do número de registros encontrados na busca pelo tópico DLLME na base de dados Web of Science entre os anos 2010 e 2020.

A DLLME é baseada em um sistema ternário de solventes: a amostra aquosa e uma mistura adequada de pequenos volumes de dois solventes, extrator e dispersor. O solvente dispersor é selecionado com base na miscibilidade na fase orgânica (solvente extrator) e na fase aquosa, na qual deve ser solúvel para facilitar a formação da dispersão. Acetona, acetonitrila e metanol são exemplos de solventes que podem ser adequados para uso como solvente dispersor, com volume entre 0,5 mL e 2,0 mL. O solvente extrator é selecionado principalmente pela capacidade de extrair os compostos de interesse da amostra. No entanto, o solvente extrator deve ser pouco solúvel na fase aquosa, deve apresentar densidade maior que a da água e deve ser capaz de formar a dispersão na forma de microgotas. Solventes como clorofórmio, diclorometano e tetracloreto de carbono são passíveis de serem utilizados como solvente extratores e o volume do solvente extrator irá determinar o fator de concentração do método. Sabe-se que solventes organoclorados apresentam alta toxicidade e frequentemente são empregados como solvente extrator na DLLME, entretanto, os volumes utilizados estão entre 10 e 500 μ L. Contudo, sistemas LC de fase reversa não são compatíveis com hidrocarbonetos halogenados, o que implica na necessidade de uma etapa extra de evaporação do solvente antes da análise. Deve-se ressaltar que o solvente extrator é o fator mais importante na DLLME. Outros fatores também interferem na eficiência de extração, entre eles os volumes dos solventes extrator e dispersor; a adição de sais, e o ajuste do pH do meio. A força iônica pode promover uma separação de fases mais adequada, enquanto que o pH pode ser ajustado para que os

analitos permaneçam na forma neutra, favorecendo a partição (Rezaee et al., 2006; Rezaee; Yamini; Faraji, 2010; Zanella et al., 2015b).

Preferencialmente em um tubo cônico, a mistura dos solventes extrator e dispersor é injetada em uma amostra aquosa, com o auxílio de uma seringa, formando uma solução turva, com pequenas gotículas do solvente extrator disperso na fase aquosa. A mistura é centrifugada e o solvente extrator é depositado no fundo do tubo, formando a fase sedimentada. Um volume de fase sedimentada é retirado com auxílio da seringa e transferido para análise. Nesta técnica o equilíbrio de partição é atingido rapidamente, devido à grande área superficial entre o solvente extrator e a amostra aquosa que contém os analitos. (Rezaee; Yamini; Faraji, 2010). O diagrama da Figura 6 demonstra as etapas da DLLME de forma simplificada.

Figura 6. Diagrama simplificado da DLLME. Fonte: adaptado de Quigley; Cummins; Connoly, 2016.

A técnica tem sido aplicada satisfatoriamente na análise de medicamentos veterinários em amostras aquosas, como na análise de leite (Sereshti et al., 2020), mel (Campone et al., 2019), água (Carabajal et al., 2021). No entanto, o uso em amostras não aquosas e de alta complexidade ainda é um desafio. Interferentes presentes na matriz são co-extraídos, o que em baixa robustez e diminuição da detectabilidade, tornando necessário um pré-tratamento da amostra (Viñas et al., 2014). Algumas modificações foram desenvolvidas, como o uso de ultrassom para facilitar a extração (*ultrasound-assisted*, UA-DLLME), o emprego de solventes de baixa densidade (*low-density solvent*, LDS-DLLME), gota orgânica solidificada (*solidified organic drop*, DLLME-SFO), emprego de líquidos iônicos (*ionic liquid*, IL-DLLME), entre outros. A automação da técnica também tem sido estudada e alguns sistemas foram aplicados

como a MSFIA-DLLME (*multi syringe flow injection analysis*-DLLME), SI-DLLME (*solvent injection*-DLLME) e a SIA-DLLME (*sequential injection analysis*-DLLME). Ainda, a associação com outras técnicas vem sendo explorada, como a MSPD-DLLME, MIP-DLLME e QuEChERS-DLLME (Zanella et al., 2015; Quigley; Cummins; Connolly, 2016).

2.4 Métodos analíticos voltados à determinação de resíduos de ERI em pescados

A implementação das técnicas de LC-MS/MS permitiu o avanço das análises de resíduos em alimentos, atingindo concentrações a nível de ultra traços. Esta abordagem é aplicável ao maior número de medicamentos veterinários no campo de análises de alimentos (Masiá et al., 2016). A cromatografia a gás (*Gas Chromatography*, GC) também possui importância no emprego para determinação desses resíduos, assim como os sistemas de detecção como o ultravioleta (*ultraviolet detector*, UV), detector de arranjo de diodos (*diode array detector*, DAD) e fluorescência (*fluorescence detector*, FD) (Frenich et al., 2010). Outras técnicas também são empregadas, como eletroforese capilar (*capillary electrophoresis*, CE), ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e nano-ELISA (Lin et al., 2012; Ma et al., 2018; Wu et al., 2019). Na Tabela 5 a seguir, são apresentados métodos analíticos para determinação de resíduos de ERI ou multirresíduos, em pescados.

Tabela 5. Métodos analíticos empregados na determinação residual de ERI em pescados.

Analito (s)	Preparo de amostra	Sistema analítico	ERI LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	ERI LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Matriz	Referência
Eritromicina e oleandomicina	SPE cartuchos de troca catiônica; eluição com CH_2Cl_2 Derivatização FMOC	LC-FLD	50	100	Músculo de peixe	Edder et al., 2002.
Macrolídeos	SPE cartucho fase reversa eluição com MeOH	LC-ESI-MS	NI	10	Músculo de peixe	Horie et al., 2003
Eritromicina	LLE com n-hexano	LC-MS/MS (TQ)	NI	50	Músculo de truta	Lucchetti et al., 2005
Eritromicina	método descrito por Lucchetti et al., 2005.	LC-ESI-MS/MS	NI	50	Músculo de truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Esposito et al., 2007.
Eritromicina	Extração com metanol e limpeza com n-hexano (baseado no método de Horie et al., 2003).	LC-ESI-MS/MS	5,0	NI	Músculo de also- alabote-japonês, Rockfish preto e truta arco-íris	Park et al., 2008.
Macrolídeos	LLE hexano saturado de MeCN	LC-MS/MS (TQ)	0,1	1,0	Músculo de peixe e camarão	Jo et al., 2011.
Multioresíduos	QuEChERS modificado, extração com MeCN:MeOH (75:25, v/v).	UHPLC-MS/MS (TQ)	7,5	25,0	Músculo de Dourado (<i>Sparus aurata</i>)	Lopes et al., 2012.
Multiclasses	Limpeza com n-hexano, SPE cartucho fase reversa e eluição com MeOH.	UPLC-MS/MS	0,5	1,0	Músculo de peixe	Tang et al., 2012

Tabela 5. Continuação: Métodos analíticos empregados na determinação residual de ERI em pescados.

Analito (s)	Preparo de amostra	Sistema analítico	ERI LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	ERI LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Matriz	Referência
Eritromicina	Duas extrações com clorofórmio	LC-MS	NI	100	Músculo de truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Vendrell et al., 2012
Eritromicina	Método descrito por Lucchetti et al., 2005.	LC-MS (QToF)	NI	25	Músculo de truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Di Salvo et al., 2013
Macrolídeos	Extração inicial em ultrassom com MeOH e sulfato de sódio anidro, duas extrações com MeOH, limpeza com n-hexano. SPE baseada em grafeno, analitos eluídos com MeOH.	UPLC-MS/MS	0,15	0,50	Músculo de carpa cruciana	Wu et al., 2013
Macrolídeos	Precipitação alcoólica de proteínas e extração simultânea, limpeza com n-hexano.	LC-MS (QToF)	5,8 – 27	17 – 82	Músculo de tilápia	Sismotto et al., 2014.
Multirresíduos	Extração com solventes: H ₂ O com ácido fórmico e EDTA, MeOH e MeCN. Extração assistida por ultrassom.	LC-MS/MS	NI	3,1	Músculo de peixe	Dasenaki; Thomaidis, 2015.

Tabela 5. Continuação: Métodos analíticos empregados na determinação residual de ERI em pescados.

Analito (s)	Preparo de amostra	Sistema analítico	ERI LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	ERI LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Matriz	Referência
Macrolídeos	Extração com 100 mL de MeCN:H ₂ O (75:25 v/v), SPE fase reversa, eluição com MeOH e amônia (95:5 v/v).	LC-DAD	NI	50	Músculo de Brema (<i>Sparus auratus</i>)	Habibi et al., 2017.
Multirresíduos	Extração com MeCN e formato de amônia, d-SPE com C18, limpeza com hexano.	LC-MS/MS (TQ)	NI	18	Músculo de peixe, enguia, camarão	Kang et al., 2018
Multirresíduos	Três extrações com MeCN em ultrassom, e SPE em série (cartuchos MAX, HLB e MCX, com diferentes eluentes, contendo principalmente água e metanol)	UPLC-MS/MS (TQ)	0,002	0,006	Músculo de peixe	Gao et al., 2020.
Multirresíduos	Extração com MeCN:H ₂ O (3:1) em ultrassom e SPE fase reversa, analitos eluídos com MeOH.	UPLC-MS/MS	0,035	0,117	Músculo de truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), Curimbatá (<i>Prochilodus lineatus</i>), pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) e salmão (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	Griboff et al., 2020

NI: não informado. TQ: analisador triplo quadrupolo (*triple quadrupole*); QToF: analisador quadrupolo e tempo de voo (*quadrupole time of flight*).

Os métodos voltados à determinação residual de ERI em pescados baseiam-se na técnica de LC associada a diferentes detectores, principalmente o MS sequencial. A técnica é predominante devido à capacidade de fornecer a confirmação da identificação do composto e de reduzir interferências cromatográficas, sobretudo com o uso do modo MRM (Siqueira et al., 2009; Lopes et al., 2012)

O procedimento de SPE é frequentemente utilizado na análise de ERI e macrolídeos, como por exemplo, Habibi et al., (2017) empregaram a técnica para a determinação de três macrolídeos, eritromicina, claritromicina e azitromicina em músculo de peixes cultivados em aquicultura. Em análise de multirresíduos, Gao et al., (2020) utilizaram SPE sequencial para determinação de 30 antimicrobianos em amostras de peixe e camarão. Apesar da SPE conseguir reduzir o efeito matriz e aumentar a sensibilidade, os métodos ainda são demorados e consomem grande volume de solvente (Li et al., 2020).

A LLE tem sido empregada na análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos há anos. Entretanto, apesar do método ser de fácil operação e muitas vezes conseguir valores de recuperação satisfatórios e boa precisão e linearidade, as desvantagens como a demanda de grande volume de reagentes, o uso de solventes tóxicos e o consumo de tempo, acabam levando ao uso de outras técnicas (Wang; Xie; Lee, 2021).

Lopes et al., (2012) utilizaram QuEChERS para extração de resíduos de 32 medicamentos veterinários em amostras de peixe. De acordo com os autores, o procedimento é rápido, simples, reprodutível e capaz de extrair analitos com diferentes propriedades físico-químicas. Os valores de LQ para as substâncias analisadas no método foram maiores ou iguais aos LMR estabelecidos pela União Europeia. O método QuEChERS foi empregado na determinação de ERI e macrolídeos em outras matrizes de alimentos, como leite (Liu et al., 2018; Zhou; Yang; Wang, 2017), ovos (Frenich et al., 2010), vegetais (Hu et al., 2014), queijo (Pérez et al., 2013), fórmulas infantis (Pereira et al., 2021) e alimentos infantis (Grutes et al., 2021).

A DLLME foi utilizada no preparo de amostras de urina (Jia et al., 2013) e de água superficial (Asati; Satunarayana; Patel, 2017), para determinação multiclases, incluindo ERI e de macrolídeos, respectivamente. Em análise de alimentos, a técnica foi empregada para avaliação da ocorrência de ERI e seus produtos de degradação em mel (Zhao et al. 2017). Não foram encontrados registros de métodos que empregaram DLLME ou QuEChERS associado à DLLME na determinação de resíduos de ERI em peixe. A revisão realizada neste trabalho a respeito dos métodos analíticos voltados à determinação de ERI em peixe é compatível com os

resultados encontrados na revisão de Hu et al. (2020) ao investigarem os métodos de preparo de amostra e os métodos analíticos utilizados para análise de macrolídeos em várias matrizes, no período de 2010 a 2020. Como evidenciado pelos autores, os macrolídeos são antimicrobianos potentes e amplamente utilizados na medicina veterinária. Os resíduos destes medicamentos podem estar presentes em alimentos e no meio ambiente mesmo em pequenas quantidades. Para preservar o meio ambiente, a saúde humana e animal, métodos que sejam capazes de monitorar os resíduos de macrolídeos e outros antimicrobianos podem contribuir para o controle do uso indevido dessas substâncias, diminuindo a disseminação de microrganismos resistentes (Hu et al., 2020).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste projeto é desenvolver, otimizar e validar um procedimento analítico para determinação residual de ERI em peixes da espécie pacu (*Piaractus mesopotamicus*). A quantificação dos resíduos será avaliada após a administração oral do ativo, para estimativa do perfil de depleção e do período de carência a ser recomendado, considerando as questões de segurança alimentar.

3.2 Objetivos específicos

- Definição dos parâmetros e condições cromatográficas e de monitoramento adequados para a quantificação de ERI por LC-MS/MS.
- Desenvolvimento e avaliação de procedimentos de incorporação de ERI na ração de peixe, propondo a obtenção de um produto homogêneo e capaz de amenizar ou evitar a lixiviação do ativo para o ambiente aquático.
- Estabelecimento e avaliação de um método de extração de ERI da ração preparada.
- Otimização, estabelecimento e avaliação de um método de extração e preparo de amostra de ERI de carne de pacu (considerando pele e músculos em proporções naturais), baseado no procedimento QuEChERS e na técnica DLLME (*Dispersive liquid-liquid microextraction*) para obtenção de um extrato apropriado para análise no sistema empregado.
- Validação dos métodos analíticos utilizados na determinação de ERI em ração e em carne de pacu, baseado em protocolos e guias nacionais e internacionais.
- Planejamento e realização de experimentos com animais e análise das amostras reais aplicando os métodos desenvolvidos.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos, instrumentos e acessórios

As análises de determinação de ERI foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência associada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). O cromatógrafo a líquido de alta eficiência utilizado (Shimadzu, Japão) é composto por duas bombas (modelo LC10-ADVP), uma controladora (modelo SCL-10AVP), um forno de coluna (modelo CTO-10AS) e um injetor automático (modelo SIL-20A). O espectrômetro de massas possui analisador triplo-quadrupolo (Quattro LC, Micromass, Reino Unido) com interface eletrospray, que foi selecionada para operar no modo positivo (ESI+). A aquisição e o processamento dos dados foram realizados pelo software Micromass MassLynx versão 4.1.

As injeções por infusão direta e infusão direta combinada com a fase móvel foram realizadas com auxílio de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus Syringe Pumps, Estados Unidos) para definição das configurações do espectrômetro de massas para análise de ERI e dos padrões internos utilizados.

Um sistema de ultra purificação de água Milli-Q Direct-Q 3 UV System (Merck Millipore, Alemanha) foi empregado para prover água ultrapurificada para o preparo das soluções aquosas utilizadas nos procedimentos analíticos.

Para a pesagem das amostras de ração e de carne de pacu, bem como os sais empregados no procedimento QuEChERS e demais reagentes, utilizou-se a balança semi-analítica de modelo Marte AL 200C (Marte Científica, Brasil). A balança analítica Shimadzu modelo AUW220D (Shimadzu, Japão) foi usada para a pesagem dos padrões analíticos para o preparo de soluções padrão estoque.

Para as extrações de ERI das amostras de ração foi utilizado um banho ultrassom Maxiclean USC-1450 (Unique, Brasil) e uma centrífuga refrigerada Himac CF5RX (Hitashi, Japão). Para o ensaio de lixiviação foi usado um agitador magnético com aquecimento Fisher *stirring hotplace* (Fisher Scientific, Estados Unidos), pHmetro Orion 420A (Thermo Electron Corporation, Estados Unidos) e termômetro Incoterm 284448 (Incoterm, Brasil).

No procedimento de extração de ERI das amostras de carne de pacu, as amostras de carne foram trituradas em moinho de bancada IKA A 11 basic (IKA Werke, Alemanha). Também foram utilizados um agitador do tipo vórtex Vortex Mixer K45-2810 KASVI basic

(Kasvi, Brasil), a centrífuga refrigerada Himac CF5RX (Hitashi, Japão) e uma concentradora a vácuo Centrivap Concentrator 78100 series (Labconco, Estados Unidos).

Todas as amostras foram filtradas em filtros de seringa com membrana de celulose regenerada de 0,20 µm (GVS Filter Technology, Reino Unido) e transferidas para vial ou insert em vial apropriados para injeção no sistema LC-MS/MS.

4.2 Reagentes e solventes

Os reagentes sólidos empregados no procedimento de extração da carne de pacu foram o sulfato de magnésio anidro padrão analítico (Sigma-Aldrich, EUA), cloreto de sódio padrão analítico (Synth, Brasil) e Amina primária-secundária (PSA – *primary secondary amine*, Agilent Technologies, Estados Unidos). No teste de robustez, parte do protocolo de validação analítica, também foram utilizados sulfato de magnésio anidro J.T. Baker (Fisher Scientific, Reino Unido) e amina primária-secundária Supelco (Sigma-Aldrich, EUA).

Durante os procedimentos de extração e para o preparo de fase móvel foram utilizados os solventes acetonitrila e metanol, ambos de grau cromatográfico bem como o ácido fórmico utilizado no preparo de fase móvel (Merck, Estados Unidos). Na etapa de microextração líquido-líquido dispersiva foram utilizados diclorometano (Panreac, Estados Unidos), dicloroetano (Riedel-de-Haen, Alemanha), clorofórmio (Tedia, Estados Unidos), hidróxido de amônio (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e Cloreto de Amônio (Synth, Brasil).

Os padrões analíticos de ERI (CAS: 114-07-8) e fenacetina (FEN, C₁₀H₁₃NO₂, CAS: 62-44-2, utilizada como padrão interno no método de quantificação da ração) possuem pureza de 97% e 98%, respectivamente (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). A Eritromicina Base (CAS: 114-07-8) utilizada no preparo da ração possui pureza de 93,8% (Gold Biotechnology, Estados Unidos). Para as análises de determinação de ERI em carne de pacu, foi utilizado o padrão deuterado: Erythromycin-D6 (ERI-D6, C₃₇H₆₁D₆NO₁₃, CAS: 959119-25-6, Toronto Research Chemicals, Canadá) como padrão interno. A estrutura química da ERI-D6 está representada na Figura 7 e a estrutura química da FEN, na Figura 8 a seguir.

Figura 7. Estrutura química da Eritromicina-d6. Fonte: Toronto Research Chemicals (E649953).

Figura 8. Estrutura química da Fenacetina. Fonte: NCBI.

4.3 Preparo de soluções padrão

As soluções padrão estoque de ERI, ERI-D6 e FEN foram preparadas separadamente, a partir dos padrões analíticos de cada um. Pesou-se 20 mg das substâncias ERI e FEN, que foram dissolvidas completamente em metanol, em balão volumétrico de 20 mL, a fim de se obter a concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Preparou-se a solução padrão estoque de ERI-D6 através da dissolução de 1,0 mg do padrão em metanol, em balão volumétrico de 10 mL, resultando em uma solução de concentração de $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir desta solução, realizou-se uma diluição em metanol, resultando em uma nova solução a $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, que foi fracionada e armazenada em tubos criogênicos contendo 1,5 mL. Estas soluções foram utilizadas conforme necessário nos procedimentos de extração e preparo de amostras. Todas as soluções padrão estoque foram armazenadas em frascos de vidro âmbar, em freezer à -20°C e foram utilizadas para o preparo de soluções de trabalho, por um período máximo de 2 meses.

A solução diluente empregada nas diluições finais das soluções padrão e das amostras foi preparada diariamente, conforme a necessidade. Esta solução consiste em metanol e água ultrapurificada, na proporção de 65% e 35% (v/v), respectivamente.

4.3.1 Estabilidade das soluções

A estabilidade das soluções padrão estoque de ERI, ERI-D6 e FEN armazenadas em freezer foi avaliada através da comparação das respostas obtidas com as soluções armazenadas e soluções preparadas no momento da análise. As análises foram realizadas periodicamente, durante 4 meses. Devido à instabilidade de ERI em soluções aquosas, preparou-se as soluções de trabalho e de amostras diariamente em solução diluente.

4.4 Procedimento de incorporação de ERI na ração

Para incorporação de ERI na ração foi desenvolvido um procedimento fundamentado nas descrições de preparo do medicamento comercial para peixes Romet-30®, composto por sulfadimetoxina e ormetoprima, aprovado pelo FDA e disponível nos Estados Unidos.

Inicialmente, preparou-se uma solução aquosa contendo 5% (p/v) de gelatina incolor e sem sabor e a 20 mL desta solução foram acrescentados o equivalente a 1,0 g do ativo ERI, formando uma suspensão. Essa suspensão foi cuidadosamente vertida em 100 g de ração que em seguida foram homogeneizados manualmente em frasco erlenmeyer. A ração foi colocada em uma bandeja de plástico e submetida a secagem em ar comprimido por 2 horas, com vazão branda e agitação manual a cada 20 minutos. Após a secagem, os pellets de ração foram triturados e pesados para o procedimento de extração descrito anteriormente. A eficiência de incorporação do fármaco na ração e a homogeneidade alcançada com esse método foram avaliadas.

A eficiência de incorporação foi avaliada pela comparação de amostras de ração medicamentosa preparadas pelo método de incorporação e por amostras de extrato fortificado (extrato de ração incorporada com gelatina, mas sem o ativo). Para isso, uma curva de calibração em extrato fortificado foi preparada e analisada, nas concentrações de 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15 mg g⁻¹, sendo que a fortificação com o ativo foi realizada após o procedimento de extração. Também foram preparadas e analisadas três amostras de extrato fortificado em triplicata e três amostras de ração em triplicata, na concentração de 10 mg g⁻¹ de ERI. A

eficiência foi calculada pela razão da média das concentrações obtidas nas amostras de ração incorporada com ERI pela média das concentrações obtidas nas amostras de extrato fortificado com ERI.

A homogeneidade da concentração do ativo na ração medicamentosa produzida foi avaliada pelo preparo de um lote de ração contendo ERI e análise de três porções deste mesmo lote de ração, sendo que as amostras foram preparadas em triplicata. As amostras e uma curva analítica em matriz também foram analisadas conforme o método proposto.

A fim de se avaliar a perda do ativo da ração medicamentosa para a água, um método utilizado em nosso grupo de pesquisa foi adotado como referência (Busatto et al., 2017; Fracarolli Neto et al., 2019; Portela et al., 2020). Em béqueres contendo 900 mL de água ultrapurificada foram adicionados 1,0 g de ração medicamentosa com ERI que foram mantidos em agitação branda. A temperatura e o pH da água foram monitoradas e o ensaio foi realizado em triplicata. Foram realizadas coletas de 5 mL nos tempos transcorridos de 5, 10 e 15 minutos, com reposição de água ultrapurificada limpa para conservar o volume de 900 mL. As alíquotas coletadas foram diluídas individualmente com água, em balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, uma nova diluição foi realizada a fim de se obter uma concentração de aproximadamente 100 ng mL^{-1} (correspondente a 10 mg g^{-1}) de ERI. O padrão interno foi adicionado e a solução foi diluída em solução diluente, filtrada e transferida para vial apropriado para injeção no sistema analítico.

Considerando que o reconhecido sabor amargo conferido pela ERI na ração, poderia resultar em baixa palatabilidade aos peixes durante o experimento de depleção aliada à baixa estabilidade do ativo em meio ácido, como descrito em outros estudos (Kaneko; Dougherty; Magee et al., 2007; Serdoz et al., 2011), o uso de tecnologia envolvendo nanopartículas contendo ERI foi considerada com o intuito de desenvolver um procedimento de incorporação alternativo. Para isso, contamos com a colaboração da professora Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari, do laboratório de Nanobiotecnologia da FCFRP-USP. Contudo, essa etapa não pôde ser concluída até o presente momento. As etapas do desenvolvimento e os testes iniciais de avaliação das nanopartículas estão apresentadas nessa dissertação na seção 9, anexo 2. Dado o bem-sucedido processo de incorporação do fármaco pelo processo envolvendo gelatina, o cumprimento das metas propostas no projeto deste trabalho pode ser atendido.

4.5 Desenvolvimento de métodos analíticos

4.5.1 Configuração do sistema LC-MS/MS para análise de ERI

No sistema cromatográfico foi empregada uma coluna analítica de fase reversa Ascentis®Express C18 de 150 mm x 4,6 mm e 2,7 μm (Supelco, Estados Unidos) e coluna de guarda de mesma composição, com 5 mm x 4,6 mm e 2,7 μm (Supelco, Estados Unidos). A fase móvel foi composta por água ultrapurificada e metanol, ambos acidificados com 0,5% de ácido fórmico, na proporção de 35:65 (v/v), respectivamente, em modo isocrático com vazão de 0,40 mL min⁻¹. A temperatura do forno da coluna foi mantida em 40°C, o tempo de duração de cada análise foi de 7 minutos e o volume de injeção de amostra foi de 5 μL .

No espectrômetro de massas, a fonte de ionização foi operada em modo positivo (ESI+), com temperatura de 100°C e a temperatura do gás de dessolvatação de 350°C. O nitrogênio foi utilizado como gás de dessolvatação sob vazão de 390 L h⁻¹ e como gás do cone a 80 L h⁻¹. A voltagem do capilar foi definida como 1 kV e o gás argônio foi empregado na câmara de colisão sob pressão de $1,78 \times 10^{-3}$ mbar.

A fim de selecionar as condições de monitoramento empregadas pelo espectrômetro de massas, foram preparadas soluções de ERI, FEN e ERI-D6 em metanol, na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as quais foram injetadas individualmente por infusão direta e por infusão combinada com a fase móvel, sob vazão de 20 $\mu\text{L min}^{-1}$. Neste procedimento foram selecionadas as transições a serem monitoradas e definidos os parâmetros de voltagem do cone e energia de colisão para cada transição.

Através do modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) dos íons das moléculas protonadas $[\text{M}+\text{H}]^+$ e seus respectivos fragmentos, foi possível monitorar duas transições para ERI, sendo uma de quantificação e outra de confirmação de identidade da substância.

Para a determinação de ERI em ração de peixe, o padrão interno utilizado foi FEN e para carne de pacu foi utilizado um padrão interno deuterado, eritromicina-d6 (ERI-D6). Na Tabela 6 são apresentadas as transições monitoradas para cada substância e as respectivas voltagens do cone e energias de colisão empregadas.

Tabela 6. Configuração do espectrômetro de massas nas transições monitoradas nos métodos de determinação de ERI.

Substância	Íon precursor (m/z)	Transição	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)
ERI	734	734>158 ^a	28	35
		734>576 ^b	28	20
FEN	180	180>110	20	30
ERI-D6	741	741>164	28	33

^a transição monitorada para quantificação do analito, ^b transição monitorada para confirmação.

A resposta instrumental obtida pelos métodos analíticos é relacionada ao padrão interno (PI) utilizado, conforme a Equação 1 a seguir:

$$Resposta = Concentração\ PI \frac{área\ ERI}{área\ PI}$$

Equação 1. Cálculo da resposta instrumental obtida com a utilização de padrão interno.

4.5.2 Curvas analíticas

Para o preparo das curvas analíticas em matriz, as matrizes foram fortificadas antes do procedimento de extração, a fim de se obter as concentrações equivalentes às respectivas curvas em solução. Para o preparo das curvas analíticas em extrato, as amostras de matriz branco foram submetidas ao processo de extração completo e então fortificadas.

As curvas analíticas em solução utilizadas na análise de determinação de ERI em ração incorporada com gelatina foram preparadas diariamente a partir da diluição da solução de padrão estoque, em cinco concentrações: 50, 75, 100, 125 e 150 ng mL⁻¹. A concentração de FEN (padrão interno) foi mantida em 600 ng mL⁻¹. Para o preparo das curvas analíticas em matriz, o procedimento de incorporação de ERI na ração foi realizado com diferentes quantidades do ativo a fim de se alcançar as concentrações de 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15 mg g⁻¹. Neste caso, o padrão interno foi adicionado após a extração, na mesma concentração da curva em solução.

As curvas analíticas para a determinação de ERI em carne de pacu foram preparadas diariamente, nas concentrações de 10; 25; 50; 100; 150 e 200 ng mL⁻¹ para a curva em solução e 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µg kg⁻¹ de ERI para a curva em matriz fortificada. A

concentração de ERI-D6 (padrão interno) foi mantida em $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (50 ng mL^{-1}). A solução padrão estoque de ERI (1 mg mL^{-1}) foi diluída em metanol, em balão volumétrico de 10 mL, a fim de se obter uma solução intermediária de concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções seguintes foram preparadas pela diluição da solução intermediária em balões volumétricos de 5 mL, com metanol. Foram transferidos $50 \mu\text{L}$ de cada uma das seis novas soluções para fortificar a matriz e preparar cada ponto da curva analítica, nas concentrações determinadas, conforme a Tabela 7 a seguir. Uma solução do padrão interno (ERI-D6) a 1000 ng mL^{-1} foi preparada e $25 \mu\text{L}$ desta também foram adicionados à matriz (concentração alvo: $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$). Após a fortificação com o ativo e com o padrão interno, os tubos contendo a matriz foram fechados e mantidos em repouso por 15 min, ao abrigo da luz, para interação do ativo com a matriz, antes do início do procedimento de preparo de amostra.

Tabela 7. Concentração das soluções utilizadas no preparo da curva analítica em matriz através da fortificação com o ativo e concentrações final de cada ponto da curva.

Solução ERI (ng mL^{-1})	Concentração ERI (ng g^{-1} ou $\mu\text{g kg}^{-1}$)
100	1,0
250	2,5
500	5,0
1000	10,0
1500	15,0
2000	20,0

4.6 Amostras branco (isentas do analito)

4.6.1 Amostras branco de ração

A ração de peixe Pirá Crescimento, produzida pela Guabi (Sales Oliveira, São Paulo) utilizada nos procedimentos de incorporação e de extração foi adquirida no Mercado Municipal de Ribeirão Preto, em Ribeirão Preto, São Paulo. A ração comercial não contém eritromicina ou outro medicamento. De maneira geral, as rações para peixes contêm ingredientes de origem animal, como farinha de carne, ossos e peixe, e de origem vegetal, como farelo de milho, arroz e soja, além de vitaminas e minerais que são necessários para a saúde e o crescimento dos peixes (SENAR, 2019).

As amostras de matriz branco foram preparadas pelo método de incorporação com gelatina, de forma que apenas a solução de gelatina a 5% foi empregada, nas mesmas

proporções, sem o ativo ERI. Após a incorporação, as amostras de matriz branco foram submetidas ao procedimento de extração descrito, sem a adição dos padrões.

As amostras de extrato de ração também foram preparadas pela incorporação com gelatina sem o ativo, mas após serem submetidas ao processo de extração completo foram fortificadas com ERI antes da análise no equipamento.

4.6.2 Amostras branco de carne de pacu

Para o desenvolvimento do método de extração e preparo das curvas analíticas em matriz, foram adquiridas amostras de peixe pacu no Mercado Municipal de Ribeirão Preto, São Paulo. Para a validação, foram adquiridas seis amostras de estabelecimentos diferentes, sendo uma adquirida em pesque e pague em Pirassununga, SP e os outros cinco em peixarias e supermercados em Ribeirão Preto, SP. As amostras de carne contendo pele e músculos em proporções naturais foram trituradas em moinho de bancada, separadas em pequenas porções, identificadas e armazenadas em sacos plásticos em freezer a -20°C . Antes da realização de experimentos, as amostras foram analisadas para verificação de eventual presença de ERI.

As amostras controles ou amostras matriz branco foram analisadas após a realização do procedimento de extração completo, sem a fortificação da matriz com o ativo. Já as amostras de matriz fortificada foram preparadas pela adição de soluções contendo quantidades conhecidas do analito e do padrão interno, antes da realização do procedimento de extração. Por fim, as amostras de extrato foram fortificadas após o processo de extração completo.

As amostras de matriz fortificada foram preparadas pela adição de soluções de ERI e de padrão interno em concentrações determinadas. Após a adição das soluções, as amostras de carne de pacu permaneceram por 15 minutos ao abrigo da luz, para interação com a matriz e logo após foram submetidas ao procedimento de extração. Este processo foi realizado no preparo das curvas analíticas em matriz fortificada e nos experimentos de desenvolvimento do método de preparo de amostra.

4.7 Métodos de preparo de amostra

4.7.1 Extração de ERI em ração

O procedimento de extração de ERI das amostras de ração medicamentosa foi realizado após a secagem dos pellets. Para isso, 10 g de ração foram triturados com gral e pistilo e, em

seguida, 0,200 g da ração triturada foram pesados e transferidos para um tubo tipo falcon de 15 mL, em triplicata. Em cada tubo foram adicionados 5 mL de metanol, que foram levados ao banho de ultrassom por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas à temperatura de 20°C, durante 5 minutos a 2200 g e logo após, uma alíquota de 250 µL do sobrenadante foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e diluída com água ultrapurificada. Desta solução, 500 µL foram transferidos para um balão volumétrico de 5 mL, no qual também foram adicionados 500 µL de uma solução de FEN (padrão interno) e o volume do balão foi completo com solução diluente. As amostras foram filtradas em filtro de membrana de poro de 0,20 µm e transferidas para vial. As concentrações alvo foram de 100 ng mL⁻¹ (10 mg g⁻¹) de ERI e 600 ng mL⁻¹ de FEN.

A eficiência de extração do procedimento utilizado para determinação de ERI em ração com gelatina foi avaliada através da comparação das respostas obtidas pelas soluções do analito puro em solução diluente e do analito em matriz fortificada, em três níveis de concentração: 5, 10 e 15 mg g⁻¹ (50, 100 e 150 ng mL⁻¹) de ERI, com seis réplicas de cada nível. Essa forma de avaliação foi empregada considerando que não houve efeito matriz significativo.

4.7.2 Extração de ERI em carne de pacu

No preparo de amostras de carne de pacu, foi utilizado o procedimento QuEChERS modificado associado à DLLME. Para os testes de extração e para o preparo das curvas analíticas em matriz, as amostras de matriz foram fortificadas com ERI e ERI-d6 antes dos procedimentos de extração. Para análise de amostras do estudo com os animais, apenas o padrão interno foi adicionado às amostras, antes da extração.

As amostras de carne foram descongeladas e 5,0 g foram pesados em tubos falcon de 50 mL. Para preparar amostras fortificadas, em seguida foram adicionados 50 uL de uma solução padrão de ERI e 25 uL de uma solução padrão de 1000 ng mL⁻¹ de ERI-D6 (padrão interno). As amostras foram mantidas em repouso, ao abrigo da luz, para estabilização. As concentrações de fortificação variaram entre 1 µg kg⁻¹ e 20 µg kg⁻¹ de ERI e o padrão interno foi mantido a 5 µg kg⁻¹.

O procedimento QuEChERS original foi modificado e empregado como preparo de amostra e a DLLME para o enriquecimento da amostra. Na etapa QuEChERS, 5 mL de acetonitrila foram adicionados aos tubos falcon contendo as amostras, que foram homogeneizados em vórtex por 1 minuto. Em seguida, no mesmo tubo foram adicionados 1,00

g de sulfato de magnésio (MgSO_4) e 0,500 g de NaCl , que foram novamente homogeneizados em vórtex durante 1 minuto. As amostras foram centrifugadas a 2900 g, durante 10 minutos à 15°C . Após a centrifugação, 2 mL do sobrenadante foram transferidos para um tubo falcon de 15 mL, contendo 0,300 g de MgSO_4 e 0,050 g de PSA, que foram homogeneizados em vórtex por 1 minuto. As amostras foram centrifugadas novamente, a 2900 g por 10 minutos e temperatura de 15°C . Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa com membrana de celulose regenerada e poro de $0,20\ \mu\text{m}$ e transferido para um novo tubo falcon de 15 mL.

Na etapa da DLLME, 1,0 mL do sobrenadante filtrado obtido na etapa QuEChERS foi transferido para um novo tubo falcon de 15 mL contendo 5,0 mL de uma solução de aproximadamente 0,5 mM de cloreto de amônio e hidróxido de amônio, pH 10. Em seguida, 250 μL de diclorometano (solvente extrator) foram injetados com auxílio de uma microseringa, formando a dispersão na forma de microgotas (solução turva). Os tubos foram homogeneizados em vórtex por 30 segundos e as amostras foram centrifugadas a 2900 g, por 20 minutos e à 15°C . Com o auxílio da microseringa, o solvente extrator foi retirado após a centrifugação e transferido para um eppendorf de 2,0 mL para evaporação em centrivap, a 30°C durante 30 minutos. Após a completa evaporação do solvente, 100 μL da solução diluente foram transferidos para os eppendorfs para ressuspensão, homogeneizando em vórtex por 1 minuto. Em seguida, as amostras foram transferidas para inserts em vials apropriados para injeção no sistema LC-MS/MS. O esquema de cada etapa do procedimento pode ser visualizado nas Figuras 9 e 10.

Figura 9. Esquema da etapa QuEChERS do procedimento de extração de ERI da carne de pacu.

Figura 10. Esquema da etapa DLLME do procedimento de extração de ERI da carne de pacu.

As condições do método de preparo de amostra e enriquecimento foram estudadas e otimizadas por meio de experimentos realizados com o uso de planejamento fatorial. Inicialmente, foram realizadas análises de triagem, utilizando planejamentos de Plackett-Burman, sendo um planejamento para cada etapa, como apresentado nas Tabelas 8 e 9. Todas as variáveis testadas e os níveis avaliados foram selecionados com base em testes efetuados previamente, durante o desenvolvimento do método de extração e com o auxílio de referências (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2010; Pereira Filho, 2018).

Para o procedimento QuEChERS, foram selecionados 7 fatores: a quantidade de MgSO_4 e de NaCl utilizados no primeiro passo do procedimento, o tempo de duração e a temperatura da primeira centrifugação, a quantidade de MgSO_4 e de PSA utilizados no segundo passo e a temperatura da segunda centrifugação.

Tabela 8. Planejamento experimental Plackett-Burman de 7 fatores para a etapa QuEChERS

Amostra	Ponto Centra l	MgSO ₄ etapa 1 (g)	NaCl (g)	Tempo centrífuga 1 (min)	Temperatur a centrífuga 1 (°C)	MgSO ₄ etapa 2 (g)	PSA (g)	Temperatura centrífuga 2 (°C)
4	1	3,0	1,0	5	25	0,150	0,025	5
5	1	1,0	0,1	15	25	0,150	0,025	25
12 (C)	0	2,0	0,5	10	15	0,300	0,050	15
9 (C)	0	2,0	0,5	10	15	0,300	0,050	15
8	1	3,0	1,0	15	25	0,450	0,075	25
1	1	1,0	0,1	5	25	0,450	0,075	5
10 (C)	0	2,0	0,5	10	15	0,300	0,050	15
7	1	1,0	1,0	15	5	0,150	0,075	5
2	1	3,0	0,1	5	5	0,150	0,075	25
6	1	3,0	0,1	15	5	0,450	0,025	5
3	1	1,0	1,0	5	5	0,450	0,025	25
11 (C)	0	2,0	0,5	10	15	0,300	0,050	15

Para estudar as condições experimentais da DLLME, 11 fatores foram selecionados: os solventes dispersor e extrator, os volumes de solvente, o volume e o pH da solução aquosa, o tempo, a velocidade e a temperatura de centrifugação e por fim, a temperatura de secagem.

Após a análise dos resultados dos experimentos de triagem, foram selecionados os fatores que apresentaram maior importância ou efeito sobre a resposta analítica do método. Posteriormente, foram realizados novos experimentos utilizando o planejamento Composto Central, apenas com os fatores selecionados na etapa de triagem, para otimização do método desenvolvido. O planejamento fatorial Composto Central está descrito na Tabela 10.

Tabela 9. Planejamento experimental Plackett-Burman de 11 fatores para a etapa DLLME.

Amostra	Ponto Central	Solvente dispersor	Volume de solvente dispersor (mL)	Solvente Extrator	Volume de solvente extrator (μL)	Volume de solução aquosa (mL)	pH	Tempo vórtex (seg)	Tempo centrifuga (min)	Velocidade centrifugação (g)	Temperatura centrifugação (°C)	Temperatura secagem (°C)
11	1	Metanol	1,5	Clorofórmio	50	3,0	12,5	45	30	2175	20	40
1	1	Acetona	0,5	Dicloroetano	50	3,0	10,5	45	30	2900	10	40
3	1	Metanol	1,5	Dicloroetano	50	7,0	10,5	15	10	2900	20	40
7	1	Metanol	1,5	Dicloroetano	350	3,0	12,5	45	10	2900	10	30
8	1	Metanol	0,5	Dicloroetano	350	7,0	10,5	45	30	2175	20	30
16 (C)	0	Acetonitrila	1,0	Diclorometano	200	5,0	11,5	30	20	2537	15	35
2	1	Acetona	1,5	Clorofórmio	350	3,0	10,5	15	30	2900	20	30
14 (C)	0	Acetonitrila	1,0	Diclorometano	200	5,0	11,5	30	20	2537	15	35
13 (C)	0	Acetonitrila	1,0	Diclorometano	200	5,0	11,5	30	20	2537	15	35
15 (C)	0	Acetonitrila	1,0	Diclorometano	200	5,0	11,5	30	20	2537	15	35
4	1	Acetona	0,5	Dicloroetano	350	3,0	12,5	15	10	2175	20	40
5	1	Acetona	1,5	Clorofórmio	350	7,0	10,5	45	10	2175	10	40
6	1	Acetona	1,5	Dicloroetano	50	7,0	12,5	15	30	2175	10	30
9	1	Metanol	0,5	Clorofórmio	350	7,0	12,5	15	30	2900	10	40
12	1	Metanol	0,5	Clorofórmio	50	3,0	10,5	15	10	2175	10	30
10	1	Metanol	0,5	Clorofórmio	50	7,0	12,5	45	10	2900	20	30

As amostras foram preparadas e analisadas na ordem gerada pelo *software*, também foram incluídas 4 corridas de ponto central (C) em cada planejamento. Os experimentos foram planejados e analisados com o *software Statistica 13.5*. O método otimizado com as condições experimentais ideais foi obtido com os resultados dos planejamentos e foi avaliado em diferentes concentrações.

Tabela 10. Planejamento fatorial Composto Central de 3 fatores para o método de extração de ERI de carne de pacu.

Amostra	MgSO ₄ etapa 1 (g)	Temperatura centrífuga 1 (°C)	Volume solvente extrator (µL)
11	2,0	7	200
1	1,0	10	100
10	3,7	15	200
14	2,0	15	370
8	3,0	20	300
5	3,0	10	100
2	1,0	10	300
7	3,0	20	100
3	1,0	20	100
9	0,32	15	200
16 (C)	2,0	15	200
4	1,0	20	300
17 (C)	2,0	15	200
6	3,0	10	300
13	2,0	15	32
15 (C)	2,0	15	200
12	2,0	23	200

Após as definições dos níveis dos fatores estudados nos experimentos de planejamento fatorial, foram realizadas análises para avaliação da eficiência de extração, comparando resultados de área obtidos pelo emprego da matriz fortificada com os resultados obtidos a partir do extrato fortificado. Esta avaliação foi realizada nas seis concentrações da curva analítica, correspondentes a 1,0; 2,5; 5,0; 10; 15 e 20 µg kg⁻¹ de ERI.

4.8 Validação dos métodos analíticos

4.8.1 Validação do método para determinação de ERI em ração

O método desenvolvido para quantificação de ERI em ração de peixe teve a sua confiabilidade verificada com base nos parâmetros de desempenho e requisitos de aceitação recomendados pelo Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica para Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários (MAPA, 2011). Visando garantir a qualidade dos resultados analíticos, o guia é direcionado a validação de métodos

analíticos para determinação de fármacos em produtos para alimentação animal, visto que a ração é utilizada como veículo na administração de medicamentos veterinários e também para a determinação de fármacos como contaminantes e monitoramento de contaminação cruzada. Segundo o guia citado, testes com finalidades quali-quantitativas para a determinação do princípio ativo em medicamentos veterinários, matérias-primas, produtos para alimentação animal e matrizes de origem biológica se classificam na categoria I. Na validação de procedimentos analíticos desta categoria, devem ser estudados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, veracidade ou recuperação e robustez.

4.8.1.1 Seletividade

A seletividade cromatográfica foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos em duplicata da solução diluente (metanol e água na proporção de 65:35, v/v), da matriz branco após o processo de extração, do analito e do padrão interno em solução (ERI a 100 ng mL⁻¹ e FEN a 600 ng mL⁻¹), da matriz branco fortificada com o analito e da matriz branco com adição do padrão interno (ERI a 100 ng mL⁻¹ e FEN a 600 ng mL⁻¹).

4.8.1.2 Efeito matriz

Conforme preconizado no guia utilizado (MAPA, 2011), para avaliar o efeito matriz preparou-se uma curva analítica com o analito em solução nas concentrações de: 50, 75, 100, 125 e 150 ng mL⁻¹ de ERI. Em seguida foram preparadas seis réplicas do analito puro em solução diluente e do extrato fortificado em três níveis de concentração de ERI: 50, 100 e 150 ng mL⁻¹, correspondentes a 5, 10 e 15 mg g⁻¹, respectivamente. Após a análise e quantificação das amostras, foi aplicado o teste F de Fischer-Snedecor, de homogeneidade de variâncias, para verificar se as variâncias obtidas com amostras matrizadas (extrato fortificado) e não matrizadas (em solução) podem ser consideradas estatisticamente iguais para cada um dos níveis de fortificação estudados. Os dados também foram testados com a distribuição de t de Student para comparação das médias das concentrações de cada nível.

4.8.1.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada através do preparo de três curvas analíticas independentes, em cinco níveis de concentração de ERI, a partir da fortificação de amostras de matriz branco

em cada concentração e da execução do método de extração. As concentrações empregadas nas curvas foram de 5;0 7,5; 10;0 12,5 e 15 mg g⁻¹ de ERI, correspondentes a 50, 75, 100, 125 e 150 ng mL⁻¹, respectivamente. Cada ponto da curva foi injetado duas vezes. A qualidade da curva analítica e sua linearidade foram avaliadas através da análise de regressão linear, na qual são calculados os coeficientes de determinação e de correlação, os resíduos e também é gerado o gráfico de resíduos para inspeção visual. Os desvios-padrão de repetibilidade de resposta instrumental foram analisados para cada nível de concentração. A homocedasticidade ou heterocedasticidade dos desvios-padrões foi avaliada pelo teste F de Fischer-Snedecor e pelo teste C de Cochran

4.8.1.4 Precisão

A precisão foi expressa por meio da repetibilidade e da precisão intermediária. Para determinar a repetibilidade, amostras de matriz branco foram fortificadas e analisadas em três níveis de concentração de ERI: 5, 10 e 15 mg g⁻¹ (50, 100 e 150 ng mL⁻¹), em três réplicas independentes. O padrão interno FEN foi mantido a 600 ng mL⁻¹. Para a avaliação da precisão intermediária foram preparadas três amostras, uma em cada nível de concentração, diariamente, em três dias diferentes. Foram considerados os critérios de aceitação conforme preconiza o guia de validação do MAPA (2011), utilizado como referência. Para o teste de repetibilidade, o coeficiente de variação deve situar-se abaixo de dois terços dos valores apresentados na Tabela 11 a seguir, conforme a concentração do analito. Para a avaliação da precisão intermediária, o coeficiente de variação da média não deve ultrapassar os valores apresentados.

Tabela 11. Critérios de aceitação para a precisão, conforme concentração do analito na ração.

Concentração (C)	Coefficiente de Variação (%)
$C < 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	35
$1 \mu\text{g kg}^{-1} \leq C < 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	30
$10 \mu\text{g kg}^{-1} \leq C < 100 \mu\text{g kg}^{-1}$	20
$100 \mu\text{g kg}^{-1} \leq C < 1000 \mu\text{g kg}^{-1}$	15
$1000 \mu\text{g kg}^{-1} \leq C < 10000 \mu\text{g kg}^{-1}$	10
$10 \text{ mg kg}^{-1} \leq C < 100 \text{ mg kg}^{-1}$	7,3
$100 \text{ mg kg}^{-1} \leq C < 1000 \text{ mg kg}^{-1}$	5,3
$1000 \text{ mg kg}^{-1} \leq C < 10000 \text{ mg kg}^{-1}$	3,7
$10 \text{ g kg}^{-1} \leq C < 100 \text{ g kg}^{-1}$	2,7
$100 \text{ g kg}^{-1} \leq C < 1000 \text{ g kg}^{-1}$	2,0

4.8.1.5 Veracidade

A determinação do parâmetro de veracidade foi realizada por intermédio de ensaios de recuperação. A matriz branco foi fortificada em três concentrações: 5, 10 e 15 mg g⁻¹ (50, 100 e 150 ng mL⁻¹) de ERI, com três repetições, mantendo o padrão interno FEN a 600 ng mL⁻¹. As análises foram realizadas no mesmo dia e no mesmo equipamento, com amostras preparadas pelo mesmo analista. Foram considerados os critérios de aceitação da veracidade conforme preconiza o guia de validação do MAPA (2011), utilizado como referência. Como a recuperação foi obtida a partir de amostras de matriz branco fortificada, o fator de recuperação, f_{rec} , foi calculado através da Equação 2:

$$f_{rec} = \frac{C_f - C_{nf}}{C_{ad}} \times 100$$

Equação 2. Cálculo do fator de recuperação.

Onde: C_f representa a concentração medida após a fortificação da matriz branco; C_{nf} a concentração medida na matriz branco não fortificada (antes da fortificação) e C_{ad} a concentração do analito puro adicionado à matriz branco.

Considerando que o estudo foi feito com matriz branco fortificada, a correção de recuperação C_{rec} é calculada através da seguinte Equação 3:

$$C_{rec} = C_{nf} + C_{ad} - C_f$$

Equação 3. Cálculo da correção de recuperação

Os fatores de recuperação médios e os coeficientes de variação foram calculados para cada nível de concentração utilizado no estudo de veracidade. As faixas de aceitação para a veracidade estão descritas na Tabela 12 a seguir.

Tabela 12. Faixa de aceitação para o Fator de Recuperação obtido no teste de veracidade, conforme concentração do analito na ração.

Concentração (C)	Faixa de Aceitação (%)
$C < 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	50 – 120
$1 \mu\text{g kg}^{-1} \leq C < 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	70 – 110
$10 \mu\text{g kg}^{-1} \leq C < 100 \mu\text{g kg}^{-1}$	80 – 110
$100 \mu\text{g kg}^{-1} \leq C < 1000 \mu\text{g kg}^{-1}$	80 – 110
$1000 \mu\text{g kg}^{-1} \leq C < 10000 \mu\text{g kg}^{-1}$	80 – 100
$10 \text{ mg kg}^{-1} \leq C < 100 \text{ mg kg}^{-1}$	90 – 107
$100 \text{ mg kg}^{-1} \leq C < 1000 \text{ mg kg}^{-1}$	95 – 105
$1000 \text{ mg kg}^{-1} \leq C < 10000 \text{ mg kg}^{-1}$	97 – 103
$10 \text{ g kg}^{-1} \leq C < 100 \text{ g kg}^{-1}$	98 – 102
$100 \text{ g kg}^{-1} \leq C \leq 1000 \text{ g kg}^{-1}$	98 – 102

4.8.1.6 Robustez

O estudo de robustez foi realizado utilizando a abordagem clássica, variando um fator de cada vez. A robustez foi avaliada por meio dos dados obtidos de injeções em duplicata do padrão de ERI em solução diluente e de amostras de matriz branco fortificada na mesma concentração, de 10 mg g^{-1} (100 ng mL^{-1}) em cada condição de desafio do método. As condições de desafio e as variações testadas foram: quantidade de ração utilizada no procedimento de 190 e 210 mg, volume de solvente extrator de 4,5 e 5,5 mL, tempo de banho ultrassom de 5 e 15 minutos, temperatura de centrifugação de 15 e 25°C , proporção de metanol na solução diluente de 60 e 70%, temperatura do forno da coluna de 35 e 45°C e concentração de ácido na fase aquosa da fase móvel de 0,4 e 0,6%. Visto que o guia do MAPA (2011) não apresenta uma faixa de aceitação para o estudo de robustez, adotou-se os critérios estabelecidos pela ANVISA no Guia de Validação Analítica da ANVISA (Brasil, 2017). De acordo com este guia, o impacto das variações no ensaio de robustez deve ser avaliado com os mesmos critérios utilizados na exatidão ou recuperação. Sendo assim, na robustez foram aceitos valores de recuperação inclusos no intervalo de 98 a 102%.

4.8.2 Validação do método analítico para determinação de resíduos de ERI em carne de peixe

O método analítico desenvolvido para determinação residual de ERI em carne de pacu, voltado para estudos de depleção residual, foi validado conforme as recomendações do guia VICH GL49 (2015). O guia VICH GL49 (2015) descreve os procedimentos necessários para avaliação da confiabilidade da performance de métodos analíticos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em estudos de depleção. Os parâmetros avaliados foram: seletividade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), linearidade, exatidão,

precisão, robustez e estabilidade em matriz. Por se tratar de uma matriz complexa, o efeito matriz também foi estudado, como recomendado na Resolução RDC nº 166 (Brasil, 2017).

4.8.2.1 Estimativa dos limites de detecção e quantificação

Para determinar o LD e o LQ, é preconizado a verificação da existência de uma relação linear entre a concentração e a resposta instrumental, permitindo estimar os limites do instrumento utilizado. Para isso, três curvas analíticas em solução nas concentrações de 10, 25, 50, 100, 150 e 200 ng mL⁻¹ foram preparadas e analisadas. Os resultados foram plotados em gráficos e as equações de reta foram obtidas. Os limites foram calculados conforme as equações a seguir.

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC}$$

Equação 4. Cálculo do limite de detecção.

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC}$$

Equação 5. Cálculo do limite de quantificação.

Onde σ é o desvio padrão dos coeficientes lineares obtidos em cada curva analítica em solução analisada e IC é a inclinação da reta obtida com as três curvas analíticas analisadas (Brasil, 2017).

Após obter a estimativa inicial dos valores de LD e LQ, as concentrações expressas em termos de solução (ng mL⁻¹) foram convertidas para termos de matriz (µg kg⁻¹). Amostras de matriz foram fortificadas nas concentrações calculadas e analisadas conforme o Anexo 3 do guia VICH GL49 (2015).

4.8.2.2 Linearidade

A Linearidade foi avaliada por meio da análise de três curvas analíticas independentes, em matriz, que foram fortificadas em seis níveis de concentração, processadas pelo método de extração e cada ponto da curva foi analisado três vezes (n=9). As concentrações foram de 1; 2,5; 5, 10, 15 e 20 µg kg⁻¹ de ERI. O padrão interno, ERI-D6, foi mantido a 5 µg kg⁻¹. Ao plotar

um gráfico das respostas em função da concentração do analito, foi possível obter a equação da reta. Avaliou-se a associação linear entre as variáveis, pelo coeficiente de correlação, a significância do coeficiente angular e a distribuição dos resíduos gerados. A homocedasticidade dos dados foi investigada para a utilização do modelo mais adequado. Para aceitação, o coeficiente de correlação linear deve estar acima de 0,990 e o coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero. As variações entre os pontos da curva devem atender também aos mesmos critérios das amostras no teste de precisão.

4.8.2.3 Especificidade, LD, LQ, precisão e exatidão

O guia VICH GL49 (2015) apresenta, no Anexo 3, um protocolo que foi projetado para determinar a especificidade, o LD e LQ, a precisão e a exatidão em um único estudo. Para isso, foram adquiridas seis matrizes brancas de diferentes fontes, que foram nomeadas de matrizes A, B, C, D, E e F. As matrizes foram fortificadas nas concentrações estimadas para o LD e LQ, na menor concentração da curva analítica, no ponto médio da curva e na maior concentração da curva analítica, sendo que foram preparadas três amostras em cada concentração. As amostras foram preparadas conforme a Tabela 13 a seguir, de forma que cada matriz estivesse representada ao menos uma vez em cada concentração. Repetiu-se o processo por mais dois dias. Para a quantificação das amostras fortificadas, diariamente foi preparada uma curva analítica em matriz. Os resultados foram plotados em um gráfico, relacionando a concentração adicionada na matriz e a concentração encontrada.

Tabela 13. Estudo para determinação da especificidade, LD, LQ, precisão e exatidão.

Concentração de fortificação	Matriz/fonte		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Branco (controle)	B, F, D	A, C, C	B, E, F
LD estimado	B, C, E	D, F, F	A, B, E
LQ estimado	C, C, E	A, B, E	D, F, D
1 ng g ⁻¹	A, B, E	A, C, D	B, E, F
10 ng g ⁻¹	B, C, E	C, E, F	A, D, F
20 ng g ⁻¹	A, B, B	D, F, F	A, C, E

Conforme o guia adotado, a precisão e a exatidão do LQ devem ser testadas para fornecer a evidência final para a determinação do LQ. Ao satisfazer os critérios de aceitação da exatidão e da precisão, o LQ estimado é aceitável.

A precisão pôde ser estudada pelo cálculo do coeficiente de variação (CV) em cada concentração avaliada e a exatidão, pela comparação dos resultados obtidos com os níveis de fortificação. Os critérios de aceitação para a precisão e para a exatidão conforme o guia adotado estão apresentados nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14. Critérios de aceitação da precisão conforme as concentrações dos analitos.

Concentração do analito	Critérios de aceitação da Repetibilidade (CV %)	Critérios de aceitação da precisão intermediária (CV %)
$< 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	30%	45%
$\geq 1 \mu\text{g kg}^{-1} < 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	25%	32%
$\geq 10 \mu\text{g kg}^{-1} < 100 \mu\text{g kg}^{-1}$	15%	23%
$\geq 100 \mu\text{g kg}^{-1}$	10%	16%

Tabela 15. Critérios de aceitação da exatidão conforme as concentrações dos analitos

Concentração do analito	Critérios de aceitação da exatidão
$< 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	-50% a +20%
$\geq 1 \mu\text{g kg}^{-1} < 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	-40% a + 20%
$\geq 10 \mu\text{g kg}^{-1} < 100 \mu\text{g kg}^{-1}$	-30% a +10%
$\geq 100 \mu\text{g kg}^{-1}$	-20% a +10%

4.8.2.4 Robustez

A robustez do método foi avaliada pelo estudo de fatores que podem sofrer mudanças com o passar do tempo, como apresentado na Tabela 16.

Tabela 16. Condições avaliadas para estudo da robustez do método analítico para determinação residual de ERI em carne de pacu.

Fator	Condição normal	Condições avaliadas	
Proporção da fase móvel (Metanol: Água ultrapurificada, ambos com 0,5% de ácido fórmico)	65:35 v/v	67:33 v/v	63:37 v/v
Reagente MgSO_4 – etapa QuEChERS	Fabricante 1		Fabricante 2
Reagente PSA – etapa QuEChERS	Fabricante 1		Fabricante 2
Quantidade de MgSO_4	0,300 g	0,270 g	0,330 g
Volume de diclorometano – etapa DLLME	250 μL	225 μL	
Temperatura do forno da coluna	40°C	45°C	35°C

O impacto das variações nas condições analíticas consideradas foi avaliado seguindo os mesmos critérios estabelecidos para o teste de exatidão.

4.8.2.5 Seletividade

A seletividade cromatográfica foi avaliada pela comparação dos cromatogramas obtidos com o ativo ERI em solução diluente (metanol e água, 65:35, v/v), matriz fortificada com o ativo, seis amostras de matriz branco de diferentes fontes e diluente.

4.8.2.6 Efeito matriz

Três curvas analíticas em extrato e em solução foram preparadas nos mesmos níveis de concentração empregados no teste de linearidade. O efeito matriz foi determinado pela comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas preparadas em solução com os coeficientes angulares das curvas preparadas em extrato (Trufelli et al., 2010; Brasil, 2017). O paralelismo das retas é indicativo da ausência de interferência dos constituintes da matriz. A demonstração foi realizada por meio de avaliação estatística, utilizando o teste F de Fisher-Snedecor e t de Student em cada nível de concentração estudado.

4.8.2.7 Estabilidade em matriz

As amostras coletadas após o estudo de depleção foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento da análise. Para avaliar a estabilidade dessas amostras nas condições propostas de armazenamento, foi realizado um estudo de estabilidade com amostras fortificadas em duas concentrações, 1 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, que foram armazenadas e analisadas em triplicata. A intenção deste estudo foi de determinar o tempo de armazenamento, evitando que ocorra degradação significativa antes das análises. A estabilidade em matriz foi considerada aceitável se a concentração média obtida após determinado período, quando comparada à análise na condição inicial, alcançar os critérios de aceitação definidos para a exatidão.

4.9 Estudo de depleção residual

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal (SP), em 18 de dezembro de 2019, protocolo número 016795/19. Uma cópia do certificado está disponível na seção 9, Anexo 1 desta dissertação.

Os experimentos com animais foram realizados no Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, supervisionado pela professora Dra. Fabiana Pilarski. Foram utilizados 110 peixes da espécie *Piaractus mesopotamicus* (Pacu), machos e fêmeas, adquiridos de piscicultor comercial.

Neste estudo foram seguidas as recomendações dos guias VICH GL48 (2015), específico para estudos de avaliação do metabolismo e da cinética de resíduos de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos, e VICH GL57 (2019), que traz recomendações adicionais para estudos de depleção em animais de espécies aquáticas. Os experimentos foram conduzidos para determinar os resíduos presentes ou a concentração de resíduos de ERI em animais tratados com a ração medicamentosa produzida em laboratório.

As condições experimentais pH, temperatura, quantidade de oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e salinidade foram monitoradas e registradas durante todo o experimento. Inicialmente, os animais foram sedados para manejo e pesados, para cálculo do peso médio e preparo da ração medicamentosa. Em seguida, foram distribuídos em 11 caixas d'água, cada caixa permanecendo com 10 animais, que foram colocados de forma a manter o peso médio similar entre as caixas. Nenhum dos animais recebeu algum tratamento com medicamentos ou produtos de uso veterinário antes dos experimentos.

A partir do peso médio dos animais e considerando que seriam alimentados com o equivalente a 1% de seu peso vivo, foi calculada a quantidade de ração medicamentosa necessária para o experimento de depleção. Para a produção da ração medicamentosa considerou-se a perda ocasionada pelo processo de incorporação para correção da dose do ativo. Uma quantidade maior foi produzida, sendo 8 lotes de ração medicamentosa, com 500 g cada lote. Os lotes foram analisados e a quantidade de ERI foi determinada. A ração medicamentosa produzida foi armazenada em geladeira a -4°C até o momento da pesagem e alimentação dos peixes.

Os peixes foram submetidos ao tratamento por via oral com a ração medicamentosa contendo 10 mg g⁻¹ de ERI, incorporados com gelatina. O tratamento realizado durou sete dias e a dose de ERI foi de 100 mg kg⁻¹ por peso vivo (Phuoc et al., 2010). A alimentação dos peixes foi adaptada para garantir o tratamento, os animais deixaram de ser alimentados duas vezes ao dia e passaram a receber somente a ração medicamentosa, uma vez ao dia.

Antes do fornecimento da ração medicamentosa aos animais, pesou-se a quantidade de ração equivalente a 1% do peso vivo médio dos animais de cada caixa. À cada porção de ração

medicamentosa pesada, adicionou-se carboximetilcelulose (CMC) para atuar como palatilizante, na proporção de 20 mL para cada quilo de ração. A possível perda do ativo após a adição de CMC foi avaliada. Durante a alimentação com a ração medicamentosa, verificou-se que todos os peixes ingeriram toda a ração fornecida ao longo do experimento.

Os peixes sofreram eutanásia nos tempos pré-determinados após o término do tratamento e para isso fez-se o uso de banho de imersão em benzocaína, a 100 mg L⁻¹, como recomendado pelo Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais (2013). Foram planejados dez dias de abate, nos períodos de 1, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 dias, no entanto, os abates foram realizados nos períodos de 1, 3, 5, 8, 11 e 15 dias. Em cada um dos dias de abate, 11 animais foram abatidos, sendo 1 controle. Os peixes foram selecionados aleatoriamente, sendo que 1 animal foi retirado de cada uma das 11 caixas e cada um foi colocado em um balde contendo benzocaína. Os peixes foram identificados e pesados, as escamas foram retiradas e a carne (músculo e pele) de cada animal foram embaladas individualmente em saco plástico e em seguida armazenadas sob resfriamento a -20°C. As amostras foram mantidas em gelo em isopor durante o transporte. No Laboratório de Cromatografia (FCFRP – USP) as amostras foram preparadas e analisadas.

As amostras procedentes do estudo foram trituradas em moinho de bancada e acondicionadas individualmente em freezer à -20°C, até o momento da análise, permanecendo congeladas. Em cada dia de análise preparou-se uma curva analítica em matriz fortificada com o analito. Ao longo do dia de análise, foram realizadas verificações no sistema, através de injeções de solução padrão de ERI e ERI-d6.

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Métodos analíticos

5.1.1 Determinação de ERI em ração

O procedimento de extração de ERI da ração foi realizado após a incorporação do ativo com gelatina e secagem dos pellets de ração. O método descrito no item 4.7.1 foi avaliado quanto a eficiência de extração, em três níveis de extração: 5, 10 e 15 mg g⁻¹, correspondente a 50, 100 e 150 ng mL⁻¹. Foram realizadas comparações de amostras do analito puro diluído em solvente e do analito em amostra de matriz fortificada. A Tabela 17 apresenta os valores médios obtidos para a eficiência de extração e a eficiência total média.

Tabela 17. Resultados obtidos para a avaliação da eficiência do método de extração de ERI da ração.

Nível de fortificação (mg g ⁻¹)	Eficiência de Extração (%) (n = 3)	Eficiência total média (%)
5	98,94	100,04
10	102,16	
15	98,99	

A eficiência total média do procedimento de extração de ERI da ração foi de 100,04%. O procedimento de extração utilizado pode ser considerado simples, visto que é realizado com apenas uma etapa de extração envolvendo metanol, uma etapa de centrifugação e diluições de uma alíquota do sobrenadante. Como forma de diminuir o uso de solventes, as diluições intermediárias foram realizadas em água ultrapurificada e a diluição final foi feita em solução diluente (água e metanol, 35:65 v/v).

5.1.2 Validação analítica do método para a determinação de ERI em ração

5.1.2.1 Seletividade

A seletividade foi demonstrada pela comparação dos cromatogramas da solução diluente, do analito e do padrão interno puros em solução diluente, da matriz branco após o processo de extração e da matriz branco fortificada, conforme as Figuras 11 e 12. Ao analisar visualmente os cromatogramas, pode-se verificar que não há interferentes da matriz ou da solução diluente no mesmo tempo de retenção do analito. Além da seletividade cromatográfica,

o modo de monitoramento de reações múltiplas aplicado no espectrômetro de massas permite o monitoramento seletivo de íons.

Figura 11. Cromatogramas referentes ao teste de seletividade do método para análise de ração: solução diluente, matriz branco, ERI em solução, matriz fortificada com ERI, FEN em solução e matriz fortificada com FEN.

Figura 12. Cromatogramas referentes a amostras de ração branco e de ração contendo o analito ERI e o padrão interno FEN, analisadas pelo método proposto para a ração, nas transições monitoradas durante as análises.

5.1.2.3 Efeito matriz

O estudo do efeito matriz também faz parte da avaliação da seletividade do método, possibilitando verificar se interferentes presentes na matriz são capazes de diminuir ou ampliar o sinal instrumental. As áreas obtidas em cada nível de fortificação foram utilizadas para os testes F de Fisher-Snedecor e t de Student e os resultados são apresentados nas Tabelas 18 e 19.

Tabela 18. Resultados obtidos nos testes F de Fisher-Snedecor nos níveis de fortificação de ERI avaliados para o estudo de efeito matriz do método analítico em ração de peixe.

Nível de Fortificação (mg g ⁻¹)	F	F _{crítico}
5	1,52	5,05
10	1,05	5,05
15	1,87	5,05

Os valores de F são menores do que os valores tabelados (F_{crítico}), o que significa que nesses níveis de concentração as variâncias podem ser consideradas iguais, ou seja, a matriz não possui um efeito importante na precisão do procedimento nos níveis avaliados.

Considerando variâncias equivalentes, foi realizado o teste t de Student para avaliar se há diferença estatística entre as médias.

Tabela 19. Resultados obtidos nos testes t de Student nos níveis de fortificação de ERI avaliados para o estudo de efeito matriz.

Nível de Fortificação (mg g ⁻¹)	t	t crítico
5	1,90	2,23
10	1,29	2,23
15	-2,00	2,23

Como os valores de t são menores do que os valores de t crítico, pode-se concluir que a matriz não afeta o ensaio em nenhum nível de concentração das fortificações, ou seja, não há efeito matriz significativo ($p > 0,05$).

5.1.2.4 Linearidade

Para a avaliação da linearidade foram considerados os coeficientes de correlação linear (r) das três curvas analíticas. Os valores de r sugerem a relação linear entre as concentrações

analisadas e a resposta analítica do sistema, para esta faixa de concentração, como apresentado na Tabela 20. A curva analítica geral, formada pelas três curvas analíticas preparadas está demonstrada na Figura 13.

Tabela 20. Equações de reta e coeficientes de correlação (r) e de determinação (R^2) obtidos em cada uma das três curvas analíticas em matriz para avaliação da linearidade

Curva em Matriz	Equação da reta	r	R^2
1	$y = 7,876x - 9,339$	0,9999	0,9998
2	$y = 7,402x + 22,946$	0,9999	0,9998
3	$y = 7,944x - 8,668$	0,9999	0,9998

Os testes estatísticos F (Fisher-Snedecor) e C de Cochran foram realizados para investigação do comportamento homocedástico dos dados. No teste F, o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi de 0,071 e o valor de $F_{\text{crítico}}$ foi de 0,198 e no teste C o valor de $C_{\text{calculado}}$ foi de 0,2812 e o valor de $C_{\text{crítico}}$ foi de 0,5065. Como o valor de F calculado é menor que o F crítico, assim como o valor C é menor que o valor de C crítico as variâncias podem ser consideradas estatisticamente não diferentes em um nível de confiança de 95%. Conforme o guia de validação do MAPA (2011) utilizado, este resultado viabiliza o uso do método dos mínimos quadrados ordinários para a regressão linear.

A equação utilizada para o cálculo do teste de Cochran está apresentada na seção 5.1.4.2 e o resultado foi comparado ao valor tabelado, considerando que na linearidade foram avaliados cinco níveis de concentração ($k = 5$) e com seis réplicas ($n = 6$).

Figura 13. Curva analítica em matriz fortificada com ERI resultante de três curvas preparadas para o teste de linearidade.

Os gráficos de distribuição de resíduos obtidos pela análise de regressão de cada curva estão apresentados na Figura 14 para inspeção visual.

Figura 14. Gráficos da dispersão de resíduos das três curvas analíticas avaliadas na linearidade.

Visto que os pontos no gráfico de resíduos estão próximos e distribuídos aleatoriamente em relação ao eixo x, sem apresentar algum comportamento regular ou tendência, somado aos resultados dos testes estatísticos F de Fischer-Snedecor e C de Cochran, pode-se considerar uma distribuição homocedástica.

5.2.1.5 Precisão

Os resultados do parâmetro de precisão obtidos pelos testes de repetibilidade e de precisão intermediária estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Resultados de repetibilidade e precisão intermediária referentes ao teste de precisão do método analítico para análise de ração contendo ERI.

Nível de fortificação (mg g ⁻¹)	Repetibilidade		Precisão intermediária	
	Concentração média (ng mL ⁻¹)	CV (%)	Concentração média (ng mL ⁻¹)	CV (%)
5	50,63	0,84	49,94	2,09
10	104,62	1,23	101,76	1,41
15	144,75	0,46	148,12	0,38

Conforme o guia analítico de validação do MAPA (2011) preconiza, em condições de repetibilidade o coeficiente de variação deve situar-se abaixo de 1,8% e para a precisão intermediária, não deve ultrapassar o valor tabelado de 2,7%. As recomendações foram atendidas para o teste de precisão.

5.2.1.6 Veracidade

O parâmetro veracidade ou recuperação foi avaliado pela análise de seis amostras em três níveis de fortificação diferentes. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 22.

Tabela 22. Resultados do teste de veracidade para o método analítico de ERI em ração

Nível de fortificação (mg g ⁻¹)	Fator de Recuperação (%)	CV (%)
5	101,4	1,30
10	101,71	2,17
15	99,2	1,87

O fator de recuperação do procedimento foi expresso pelos fatores de recuperação médios obtidos em cada nível de concentração. De acordo com o guia analítico de validação do MAPA (2011), esses valores estão dentro da faixa de aceitação preconizada para este teste

5.2.1.7 Robustez

Para a avaliação da robustez, foram selecionadas condições experimentais sujeitas a variações durante a realização do procedimento pelo analista, que podem ocorrer durante a rotina analítica. Foi utilizada a abordagem clássica, variando um fator de cada vez, como mostra a Tabela 23.

Tabela 23. Resultados do teste de robustez para o método de determinação de ERI em ração.

Desafio	Concentração média (ng mL ⁻¹)	Fator de Recuperação (%)
Condições normais	100,53	-
Forno da coluna a 35°C	102,23	101,68
Forno da coluna a 45°C	98,48	98,45
Ultrassom 5 min	100,24	99,71
Ultrassom 15 min	99,45	99,42
Quantidade de amostra 190 mg	98,53	98,00
Quantidade de amostra 210 mg	99,23	98,70
Centrífuga a 15°C	98,81	98,28
Centrífuga a 25°C	101,90	101,35
Diluyente com 60% Metanol	100,71	100,18
Diluyente com 70% Metanol	98,67	98,14
Solvente extrator 4,5 mL	101,09	100,55
Solvente extrator 5,5 mL	100,34	99,80
Fase aquosa ácido fórmico 0,4%	98,20	97,67
Fase aquosa ácido fórmico 0,6%	97,55	97,03

Como o guia do MAPA (2011) não apresenta um critério de aceitação para o teste de robustez, utilizou-se a faixa preconizada pela ANVISA. De acordo com o Guia para Tratamento Estatístico da Validação Analítica da ANVISA (Brasil, 2017), para métodos quantitativos, o impacto das variações deve ser avaliado com os mesmos critérios utilizados na exatidão ou recuperação. Assim, a faixa de aceitação preconizada para a recuperação do teste de robustez é de 98% - 102%. Neste caso, durante o procedimento analítico, ressalta-se o cuidado no preparo das soluções de fase móvel, para que não ocorram variações na concentração de ácido fórmico que podem interferir no método cromatográfico e na quantificação do ativo.

Ao atender os critérios indicados nos guias analíticos utilizados para esta validação, pode-se considerar que o método para determinação de ERI em ração de peixe foi validado e, portanto, fornece resultados confiáveis para a finalidade proposta.

5.1.3 Desenvolvimento do método para a determinação de ERI em carne de pacu

A estratégia inicial adotada para o desenvolvimento do método de preparo de amostra para determinação de ERI em carne de pacu era utilizar a DLLME após uma extração com solvente. No entanto, a elevada complexidade da matriz e as baixas eficiências de extração evidenciaram a necessidade de uma etapa de limpeza do extrato mais eficiente. O emprego do procedimento QuEChERS original e com modificações também foi avaliado, visto que esta abordagem tem sido bastante aplicada em análises de compostos orgânicos em matrizes complexas, como a carne de peixe. Contudo, o extrato obtido a partir deste procedimento apresentava turbidez, um indicativo de que a amostra não estava solubilizada adequadamente no solvente (acetonitrila) e que a injeção no sistema LC-MS/MS não seria recomendada. Após a associação das duas técnicas preparo de amostras, o procedimento QuEChERS modificado seguido da DLLME, resultados mais promissores em termos de eficiência de extração, recuperação e limpeza do extrato foram alcançados. De um modo geral, o procedimento de extração desenvolvido é de fácil execução e fornece adequada eficiência de extração. O ganho de detectabilidade é a maior vantagem da associação das técnicas, pois a (pré) concentração do analito ao final do processo é de grande importância para a aplicação no estudo de depleção residual.

O método de extração para determinação residual de ERI foi otimizado através da realização de experimentos desenhados com planejamento fatorial. Essa abordagem possibilita a observação de interações entre as variáveis, que podem ser sinérgicas ou antagônicas, além

de prever a resposta do sistema em condições que não haviam sido testadas anteriormente (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2010; Pereira Filho, 2018; Ferreira et al., 2019).

Inicialmente, as etapas QuEChERS e DLLME foram estudadas separadamente em estudos de triagem, por meio de planejamento fatorial fracionário de dois níveis de Plackett-Burman. Este tipo de planejamento é conveniente pois permite testar um grande número de fatores com um número menor de experimentos e obter a significância estatística dos parâmetros testados. Foram adicionados quatro pontos centrais (C) por bloco, em cada planejamento fatorial. Os pontos centrais estão, de fato, no centro do planejamento, onde todos os fatores são selecionados em seu ponto médio. A análise dos pontos centrais possibilita uma comparação das medidas da variável dependente (resposta instrumental) no ponto médio com o restante dos experimentos do planejamento e também estimar a variabilidade do erro da variável dependente (Pereira Filho, 2018). A ordem dos experimentos foi randomizada, incluindo os pontos centrais.

No planejamento executado para o procedimento QuEChERS, avaliou-se 7 fatores através de apenas 8 experimentos e 4 pontos centrais. Entre os fatores analisados, dois: 1) a quantidade de MgSO_4 e 2) a temperatura de centrifugação, ambos da primeira etapa do procedimento QuEChERS, parecem ser estatisticamente significantes para a variável dependente, como pode ser visualizado no gráfico de Pareto na Figura 15.

Figura 15. Gráfico de Pareto de efeitos padronizados para avaliação dos fatores no procedimento QuEChERS.

Conforme o gráfico de Pareto, a quantidade de MgSO_4 apresentou efeito negativo sobre a variável dependente, assim, quanto maior a quantidade do sal, menor a resposta instrumental,

enquanto que a temperatura da centrífuga apresentou efeito positivo: ao aumentar a temperatura, espera-se um aumento da resposta instrumental.

Outra forma de verificar os fatores importantes é através do gráfico de probabilidade normal dos efeitos. Neste gráfico, os efeitos são classificados e plotados em relação à probabilidade normal esperada. De forma geral, os efeitos devidos a ruído aleatórios são distribuídos com média de 0 e desvio padrão específicos e plotados ao longo de uma linha de referência no gráfico, com declive ascendente. No entanto, os efeitos significativos ou importantes para a variável dependente não serão plotados ao longo da mesma linha. O gráfico de probabilidade normal dos efeitos para este estudo está representado na Figura 16 a seguir.

Figura 16. Gráfico de probabilidade normal dos efeitos para avaliação dos fatores e efeitos no procedimento QuEChERS.

Após a inspeção visual, nota-se que os mesmos fatores identificados no gráfico de Pareto estão destacados no gráfico de probabilidade normal dos efeitos. Estes fatores foram considerados importantes para a resposta instrumental e foram estudados no planejamento composto central.

Para a DLLME, 11 fatores foram estudados por meio de um planejamento Plackett-Burman. Foram realizados 12 experimentos com 4 pontos centrais, em um mesmo dia. Ao analisar o gráfico de Pareto, na Figura 17, nota-se que um único fator é capaz de influenciar de maneira significativa a variável dependente.

Figura 17. Gráfico de Pareto de efeitos padronizados para avaliação dos fatores e efeitos no procedimento QuEChERS.

O volume de solvente extrator apresentou efeito positivo sobre a variável dependente, portanto, pode-se esperar uma ampliação da resposta instrumental com um aumento do volume de solvente extrator. No gráfico de probabilidade normal dos efeitos, é possível identificar o mesmo fator em destaque, na Figura 18.

Figura 18. Gráfico de probabilidade normal dos efeitos para avaliação dos fatores e efeitos no procedimento DLLME.

Após os experimentos de triagem, foram identificados três fatores importantes. Com o propósito de realizar um ajuste fino dessas variáveis, foi aplicado um planejamento composto central, para eleger as melhores condições para o método de extração.

O planejamento composto central de três fatores, representado por 2^3 , resultou em 17 experimentos que foram executados aleatoriamente em apenas 1 bloco de análises. Os demais componentes do desenho experimental foram: pontos do cubo (nc), 6 pontos estrela (ns), $\alpha = 1,6818$ e 3 pontos centrais (n0)

Com o objetivo de selecionar as condições mais eficientes para o método, os fatores estudados foram o volume de solvente extrator, a quantidade de MgSO_4 na primeira etapa do procedimento QuEChERS. A resposta avaliada foi a área de ERI obtida nos cromatogramas após as análises dos experimentos. Os resultados experimentais foram tratados estatisticamente pela ANOVA. Na análise dos efeitos lineares principais, variações significativas na resposta foram identificadas para os três fatores estudados (Figura 19). No entanto, o modelo linear não obteve o melhor ajuste entre os demais modelos avaliados.

Figura 19. Gráfico de Pareto para análise dos efeitos lineares principais dos três fatores estudados.

Ao analisar o modelo linear/quadrático dos efeitos principais, é possível identificar que o efeito de interação e os efeitos quadráticos são estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para dois dos três fatores estudados (Figura 20).

Figura 20. Gráfico de Pareto para análise dos efeitos lineares/quadráticos dos três fatores estudados.

Para resumir os resultados dos experimentos de planejamento composto central, gráficos de superfície resposta foram plotados nas Figuras 21, 22 e 23.

Figura 21. Efeitos dos fatores volume de solvente extrator e temperatura da centrífuga (com 0,5 g de MgSO_4)

Figura 22. Efeitos dos fatores volume de solvente extrator e temperatura da centrífuga (com 1,0 g de MgSO_4)

Figura 23. Efeitos dos fatores volume de solvente extrator e temperatura da centrífuga (com 2,0 g de MgSO_4).

De modo geral, a superfície de resposta exhibe a curvatura máxima próximo de seu máximo e nas regiões distantes do máximo a curvatura costuma ser desprezível. Outra forma de encontrar as condições ideais do procedimento é pela análise gráfico de contorno (Figura 24).

Figura 24. Gráfico de contorno com os efeitos dos três fatores estudados (1 g MgSO_4)

Um modelo para descrever a resposta (área) foi sugerido, de acordo com os resultados estatísticos das análises experimentais, descrito na Equação 6.

$$y_{\text{pred}} = 202525 + 41768 x_1 - 28135 x_1^2 - 15709 x_2 - 29,9 x_2^2 - 2411 x_3 + 4906 x_3^2 + 5091 x_1 x_2 + 5335 x_1 x_3 - 4238 x_2 x_3$$

Equação 6. Modelo sugerido para descrever a resposta instrumental.

Onde y_{pred} é a resposta (área) predita, x_1 é a variável 1 (volume de solvente extrator), x_2 é a variável 2 (quantidade de MgSO_4) e x_3 é a variável 3 (temperatura da centrífuga).

Com os resultados, foi possível selecionar as condições mais eficientes para o preparo de amostra utilizando QuEChERS associado a DLLME. No entanto, considerando a temperatura da centrífuga, foi possível notar na prática que utilizando a condição otimizada (temperatura de 4 a 6°C), houve maior variação no volume sedimentado de solvente orgânico após a centrifugação, gerando também maior variabilidade nos resultados. Desta maneira, optou-se por manter a temperatura um pouco mais alta, a 15°C. O volume de solvente extrator foi mantido em 250 μL e a quantidade de MgSO_4 em 1,0 g. Após as definições, foram realizados experimentos para avaliar a eficiência do método.

A avaliação da eficiência de extração foi realizada nas seis concentrações da curva analítica, correspondentes a 1,0; 2,5; 5,0; 10; 15 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de ERI, considerando os valores de área obtidos em amostras preparadas em matriz fortificada e amostras preparadas em extrato fortificado. Os resultados estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24. Resultados médios (n=3) obtidos pela análise de curvas em matriz e em extrato para cálculo da eficiência de extração.

Concentração de ERI ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Áreas médias obtidas matriz fortificada (n =3)	Áreas médias obtidas extrato fortificado (n =3)	Eficiência de extração (%)
1,0	4100,85	4457,85	91,99
2,5	7878,56	11607,57	67,87
5,0	16537,42	23479,51	70,43
10,0	35198,85	45397,94	77,43
15,0	47152,62	72882,85	64,70
20,0	73776,6	96326,27	76,59

A eficiência média do procedimento de extração otimizado é de 75%. Sabe-se que a carne de pacu contém principalmente água, proteínas e lipídios e é considerado um peixe com alto teor de gorduras (Zuanazzi, et al., 2013). A limpeza do extrato foi realizada visando contornar as possíveis interferências que estes componentes da matriz podem causar, evitando ainda a perda do analito. O procedimento de extração desenvolvido alcançou baixo limite de quantificação, fator importante para a aplicação para a qual o método foi proposto. Dessa forma, o método foi considerado satisfatório para o objetivo deste trabalho e sua confiabilidade foi avaliada pela validação analítica.

5.1.4 Validação do método analítico para determinação residual de ERI em carne de peixe.

5.1.4.1 Estimativa dos limites de detecção e quantificação

Os valores para o LD e o LQ foram estimados pelos parâmetros obtidos com as curvas analíticas em solução, sendo de $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (correspondente a $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ e $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$) de ERI, respectivamente. Na Tabela 25 são apresentados os coeficientes linear e angular para cada curva analítica e o desvio padrão do coeficiente linear, utilizados para os cálculos dos limites. Na Figura 25 está representado o gráfico com a reta e a equação da reta resultante das três curvas analisadas.

Tabela 25. Parâmetros das curvas analíticas em solução utilizados para o cálculo da estimativa do LD e LQ.

Curvas analíticas em solução	Coeficiente linear ou intercepto	Desvio padrão do intercepto (σ)	Coeficiente angular ou inclinação
1	1,0818		0,7543
2	0,9199	0,35	0,7315
3	0,4163		0,7507

Figura 25. Reta e equação de reta obtidas pela análise de três curvas analíticas de ERI em solução.

5.1.4.2 Linearidade

As três curvas analíticas preparadas em matriz foram analisadas e as respostas adquiridas em função da concentração do analito estão representadas graficamente na Figura 26.

Figura 26. Representação gráfica das respostas obtidas em função da concentração de ERI no teste de linearidade com os resultados das três curvas analíticas preparadas em matriz.

Os valores dos coeficientes de correlação linear (ou coeficiente de Pearson, r), para as três curvas analíticas em matriz cumpriram o critério $r \geq 0,990$, sugerindo associação linear entre as variáveis. As equações de reta e os respectivos coeficientes estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26. Equações de reta e coeficientes de correlação (r) e de determinação (R^2) obtidos em cada uma das três curvas analíticas em matriz para avaliação da linearidade

Curva em Matriz	Equação da reta	r	R^2
1	$y = 7,1484x + 2,897$	0,9993	0,9986
2	$y = 7,3763x + 2,7581$	0,9994	0,9988
3	$y = 7,3312x + 0,9869$	0,9994	0,9989

Cada um dos pontos de cada curva analítica foi analisado em triplicada (n=9). A variância, a média das respostas instrumentais, o desvio padrão e o coeficiente de variação obtidos para cada concentração estão apresentados na Tabela 27.

Tabela 27. Respostas médias, variâncias, desvios padrão e coeficientes de variação para cada concentração estudada na curva analítica (n=9).

Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Resposta média	Variância	Desvio padrão	CV(%)
1,0	9,36	1,65	1,28	13,73
2,5	19,58	1,37	1,17	5,98
5,0	40,16	4,07	2,02	5,03
10,0	73,53	2,52	1,59	2,16
15,0	113,51	1,96	1,40	1,23
20,0	146,91	4,60	2,14	1,46

Segundo as recomendações do guia VICH GL49 (2015), para curvas analíticas geradas pela fortificação de matriz e processadas pelos procedimentos de preparo de amostra, os critérios de aceitação devem ser os mesmos aplicados às amostras no teste de precisão. Os critérios de aceitação da variabilidade dependem da concentração do analito e estão apresentados na seção 5.1.4.3.

Para avaliação da homocedasticidade das variâncias, foi realizado o teste de Cochran, adotando o preconizado pela ANVISA (Brasil, 2017). O teste de Cochran compara a maior variância com as demais, conforme a Equação 7 a seguir:

$$C = \frac{s_{\max}^2}{\sum_{i=1}^k s_i^2} = \frac{\text{maior variância}}{\text{soma de todas as variâncias}}$$

Equação 7. Cálculo do teste C de Cochran.

Na qual k representa o número de níveis do fator e s_i^2 representa a variância amostral. Para a linearidade, foram avaliados 6 níveis de concentração (k = 6) e 9 réplicas de cada nível

($n = 9$). Após o cálculo de C , o valor calculado é comparado a um valor tabelado e se $C \geq C_{\text{crítico}}$, os dados são heterocedásticos e caso $C < C_{\text{crítico}}$, as variâncias podem ser consideradas homogêneas. Neste caso, o valor de C foi de 0,284 enquanto que o valor de $C_{\text{crítico}}$ foi de 0,3817. Como $C < C_{\text{crítico}}$, pode-se considerar a hipótese nula como verdadeira, com os dados homocedásticos. Outra forma de avaliar a homocedasticidade é através do teste F de Fisher-Snedecor, para comparação de duas variâncias. Neste teste, utilizou-se a variável de maior e a de menor variância para comparação e os resultados são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28. Valores obtidos no teste F de Fisher-Snedecor e valor crítico para avaliação da homocedasticidade.

	Variável 1	Variável 2
Média	146,91	19,58
Variância	5,17	1,54
Observações	9	9
Gl	8	8
F	3,35	
P (F<=f) uni-caudal	0,0532	
F_{crítico} uni-caudal	3,44	

Como $F < F_{\text{crítico}}$ as variâncias podem ser consideradas equivalentes ($p > 0,05$) e este é mais um indicativo da homocedasticidade dos dados.

A análise de regressão foi realizada por meio da ANOVA de Mínimos Quadrados Ordinários, e a partir desta análise é possível avaliar os gráficos de resíduos de cada uma das três curvas analíticas, como mostra a Figura 27.

Figura 27. Gráfico de distribuição de resíduos resultante de análise de regressão com os resultados obtidos das três curvas analíticas em matriz.

Através da inspeção visual do gráfico de distribuição de resíduos, nota-se que a dispersão dos dados é aleatória e não apresenta algum formato ou tendência que possa indicar heterocedasticidade, corroborando com os testes estatísticos realizados.

A significância do coeficiente angular foi avaliada pelo teste F da ANOVA, seguindo as recomendações da ANVISA (Brasil, 2017). O teste F da ANOVA teve valor de 28979 e o $F_{\text{crítico}}$, 4,206. O valor-P foi de 0,000027. Como o valor de $F > F_{\text{crítico}}$ e $p < 0,05$, com um nível de confiança de 95% podemos concluir que a variável explicativa (x) possui correlação com a variável resposta (y).

5.1.4.3 Precisão e exatidão

A especificidade, os limites de detecção e quantificação, a precisão e a exatidão foram determinados em um único estudo, conforme o Protocolo para Validação de Métodos de Resíduos, disponível no Anexo 3 do guia VICH GL49 (2015). Durante três dias, dezoito amostras de seis fontes diferentes de matriz e uma curva analítica em matriz foram preparadas e analisadas e os resultados de concentração obtidos encontram-se na Tabela 29.

Tabela 29. Resultados obtidos no estudo realizado para determinação de LD, LQ, precisão e exatidão a partir da fortificação de matriz com ERI nos níveis apontados.

Concentração adicionada ng g^{-1}	Animal	Dia 1 Concentração obtida $\mu\text{g kg}^{-1}$	Animal	Dia 2 Concentração obtida $\mu\text{g kg}^{-1}$	Animal	Dia 3 Concentração obtida $\mu\text{g kg}^{-1}$
LD estimado 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	B	0,20	D	0,19	A	0,20
	C	0,21	F	0,17	B	0,21
	E	0,20	F	0,19	E	0,19
LQ estimado 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	C	0,45	A	0,50	D	0,46
	C	0,47	B	0,51	F	0,45
	E	0,49	E	0,49	D	0,49
1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	A	0,99	A	1,15	B	1,13
	B	1,02	C	1,13	E	1,08
	E	1,00	D	1,16	F	1,13
10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	B	10,19	C	11,87	A	10,83
	C	10,36	E	10,77	D	11,50
	E	10,93	F	11,43	F	10,78
20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	A	19,60	D	22,33	A	19,89
	B	19,46	F	21,52	C	19,44
	B	20,43	F	22,73	E	19,96

A exatidão é relacionada ao erro sistemático e refere-se à proximidade da concordância entre o valor verdadeiro da concentração do analito e a concentração média obtida pela aplicação do procedimento. A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos de análises de amostras independentes, como descrito no método analítico a ser validado. Deve

incluir um componente intra-corridas (repetibilidade) e inter-corridas (precisão intermediária). Os resultados dos testes de exatidão e precisão estão na Tabela 30.

Tabela 30. Resultados dos testes de exatidão e precisão para o método de determinação de ERI em carne de pacu.

Concentração $\mu\text{g kg}^{-1}$	Erro relativo (%)	Precisão CV (%)			
		Repetibilidade dia 1	Repetibilidade dia 2	Repetibilidade dia 3	Precisão intermediária
LDe 0,1	-1,71	3,90	4,57	5,56	6,19
LQe 0,5	-4,1	4,52	1,25	4,20	4,54
1	+8,63	1,53	1,47	2,64	6,27
10	+9,62	3,69	4,87	3,64	4,97
20	+2,97	2,64	2,77	1,43	6,18

*LDe: limite de detecção estimado e LQe: limite de detecção estimado.

De acordo com o guia VICH GL49, a exatidão de métodos de análise de resíduos depende da concentração do analito. Os critérios estabelecidos estão apresentados na Tabela 31.

Tabela 31. Faixas aceitáveis para a exatidão segundo a concentração do analito.

Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Faixa aceitável para exatidão
< 1	-50% a +20%
$\geq 1 < 10$	-40% a +20%
$\geq 10 < 100$	-30% a + 10%
≥ 100	-20% a +10%

Para métodos de determinação de resíduos em estudos de depleção, geralmente não há necessidade de determinar a reprodutibilidade (precisão intra-laboratorial), pois o laboratório que está validando o método frequentemente é o mesmo onde as amostras do estudo de resíduos serão analisadas (VICH GL49, 2015). A precisão deve incluir a concentração do LQ ao longo dos três dias de análises. Os valores dos coeficientes de variação (CV) utilizados como critério de aceitação da precisão são exibidos na Tabela 32.

Tabela 32. Coeficientes de variação aceitáveis para o teste de precisão segundo a concentração do analito.

Concentração do analito ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CV aceitável repetibilidade	para	CV aceitável intermediária	para	precisão
< 1	30%		45%		
$\geq 1 < 10$	25%		32%		
$\geq 10 < 100$	15%		23%		
≥ 100	10%		16%		

Pode-se verificar que o método proposto contempla os critérios estabelecidos pelo guia adotado para os testes de precisão e exatidão.

5.1.4.4 Robustez

Apesar dos métodos de determinação de resíduos serem realizados em um mesmo laboratório, em um mesmo instrumento, deve-se avaliar a robustez especialmente relacionada a fatores que podem sofrer modificações com o tempo (VICH GL49). A concentração média das amostras ($n=3$), os respectivos fatores de recuperação e os erros relativos são apresentados na Tabela 33.

Tabela 33. Concentração média, fatores de recuperação e erro relativo obtidos no teste de robustez do método.

Fator	Concentração média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Fator de Recuperação (%)	Erro relativo (%)
Condições normais	10,40	104	+4
Forno da coluna a 35°C	9,99	99,9	-0,1
Forno da coluna a 45°C	10,01	101	+1
Proporção fase móvel 67:33 v/v	11,00	110	+10
Proporção fase móvel 63:37 v/v	11,29	112,9	+12,9
Fabricante Reagente MgSO_4	11,86	118,6	+18,6
Quantidade MgSO_4	10,70	107	+7
Quantidade MgSO_4	11,18	111,8	+11,8
Fabricante Reagente PSA	12,85	128,5	+28,5
Volume de diclorometano 225 μL	11,09	110,9	+10,9

O critério para aceitação da robustez não é definido no guia adotado, mas serão considerados os mesmos critérios da exatidão, como preconiza a ANVISA (Brasil, 2017). Para a concentração estudada ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$), o erro relativo deve situar-se entre -30% e +10%. Entre os fatores estudados, a proporção da fase móvel, o fabricante de PSA, o fabricante e a quantidade de MgSO_4 e o volume de diclorometano requerem cuidado no preparo e execução para minimizar possíveis alterações que podem influenciar na resposta instrumental.

5.1.4.5 Seletividade

Através do modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) utilizado no espectrômetro de massas, é possível selecionar o íon precursor e as transições que geram os fragmentos. Para a ERI foram selecionadas duas transições, que aliadas ao tempo de retenção

do analito tornam o método mais seletivo. Ainda, seis amostras de matriz branco de fontes diferentes foram analisadas após o procedimento de extração completo, bem como as matrizes fortificadas, os analitos preparados em solução diluente e a solução diluente (Figura 28). A seletividade pode ser demonstrada através da comparação dos cromatogramas na Figura 29, onde é possível verificar a ausência de interferentes. Os sinais detectados e integrados nas matrizes controles C e E, correspondem a menos de 20% da resposta detectada na concentração correspondente ao LQ.

Figura 28 Cromatogramas de matrizes branco (peixes controle) de seis fontes diferentes obtidos no modo MRM na transição de quantificação da ERI.

Figura 29. Cromatogramas de (a) diluente, (b) do analito ERI em solução diluente, (c) do analito em matriz fortificada e (d) do analito em extrato fortificado, obtidos no modo MRM na transição de quantificação de ERI.

5.1.4.6 Efeito matriz

Matrizes complexas apresentam um número indefinido de substâncias, além do analito de interesse (Brasil, 2017). É recomendada a avaliação do efeito matriz quando a espectrometria de massas é utilizada como sistema de detecção em associação com a cromatografia líquida, visto que essas substâncias presentes na matriz podem causar alterações na ionização e dessa forma, modificar também a sensibilidade, precisão e seletividade do método (FDA, 2018). O gráfico em que foram plotadas as curvas analíticas está representado na Figura 30. O teste F de Fisher-Snedecor foi realizado para comparação das variâncias em cada nível de fortificação e os resultados estão demonstrados na Tabela 34.

Tabela 34. Resultados obtidos nos testes F de Fisher-Snedecor nos níveis de fortificação de ERI avaliados para o estudo de efeito matriz do método analítico em carne de pacu.

Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	F	F crítico
1	16,59	19
2,5	4,49	19
5	7,35	19
10	0,16	0,053
15	3,13	19
20	0,74	0,053

Como os valores de F são menores do que os valores tabelados ($F_{\text{crítico}}$), exceto para as concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, há indicação de que estas variâncias são diferentes. O teste t de Student foi realizado conforme as variâncias equivalentes ou diferentes, para comparação das médias, com a hipótese alternativa de que as médias são diferentes. Os resultados estão apresentados na Tabela 35.

Tabela 35. Resultados observados nos testes t de Student nos níveis de fortificação de ERI avaliados para o estudo de efeito matriz do método analítico em carne de pacu.

Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	T	t crítico bi-caudal
1	0,45	2,78
2,5	1,53	2,78
5	2,11	2,78
10	3,38	3,18
15	7,24	2,78
20	5,12	2,78

Em razão dos valores de t calculados serem maiores do que o valor de $t_{\text{crítico}}$ nas concentrações de 10, 15 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, as médias não são estatisticamente equivalentes e não é possível presumir que não há efeito matriz significativo ($p > 0,05$).

Figura 30. Retas e equações de retas de curvas analíticas em extrato e em solução para avaliação do efeito matriz do método analítico de determinação residual de ERI em carne de pacu.

As retas formadas pela relação da área em função da concentração de ERI em curvas analíticas preparadas em solução e em extrato não são paralelas. Os coeficientes angulares das curvas foram comparados pelos testes F de Fisher-Snedecor e pelo teste t de Student. Os resultados estão na Tabela 36.

Tabela 36. Comparação estatística entre os coeficientes angulares de três curvas analíticas em solução e três curvas analíticas em extrato fortificado.

	Coeficientes angulares	F	Teste F F crítico	t	Teste t t crítico bi caudal
Curvas analíticas em solução	5669,3 5437,1 5363,4	0,48	0,053	5,72	2,77
Curvas analíticas em extrato fortificado	4729,1 4948,3 4866,5				

Considerando que $F > F$ crítico e $t > t$ crítico, com um nível de significância de 5%, é possível afirmar que há interferência significativa da matriz no método analítico para determinação residual de ERI em carne de pacu. O efeito matriz foi calculado pela equação a seguir:

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \frac{bE - bS}{bS} \times 100$$

Equação 8. Cálculo do efeito matriz. Fonte: Brasil, 2017.

Na qual: bE é o coeficiente angular das curvas analíticas em extrato fortificado com o analito, após o procedimento de extração e bS é o coeficiente angular das curvas analíticas do analito em solução. O valor calculado foi de -11,694%, indicando a presença de uma supressão de sinal da ERI.

O efeito matriz pode ser compensado pelo uso do padrão interno deuterado, ERI-d6. Ainda, a determinação residual de ERI em amostras deve ser precedida de análise da curva em matriz (EC, 2019).

5.4.7 Estabilidade em matriz

Um estudo de estabilidade em matriz foi realizado para auxiliar na determinação das condições de armazenamento das amostras e do tempo que as amostras podem permanecer sob

essas condições sem sofrer degradação significativa antes das análises. As amostras foram fortificadas na menor e na maior concentração da curva analítica ($1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $20,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ de ERI). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados estão na Tabela 37. Durante as análises das amostras de estabilidade, foi possível perceber que não houve alteração do perfil cromatográfico da amostra.

Tabela 37. Resultados do teste de estabilidade em matriz de amostras fortificadas com ERI e armazenadas em freezer à -20°C .

Amostra	Concentração média ($\mu\text{g kg}^{-1}$) n=3	Recuperação (%)	Erro relativo (%)
Inicial	1,04	104	+4
	20,20	101	+1
Estabilidade após 24 h	0,94	94	-9
	19,46	97,3	-2,7
Estabilidade após 4 dias	0,82	82	-18
	18,79	93,95	-6,05
Estabilidade após 15 dias	0,85	85	-15
	17,94	89,7	-10,3
Estabilidade após 40 dias	0,59	59	-41
	17,53	87,62	-12,38

O intervalo aceito para a exatidão para as amostras de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ é compreendido na faixa entre -40% a $+20\%$ e para as amostras de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, entre -30% a $+10\%$, conforme o estabelecido para a exatidão. Os resultados indicam que em até 15 dias após o armazenamento é possível analisar as amostras sem que ocorra degradação excessiva.

Devido à instabilidade do ativo em soluções aquosas, as amostras foram processadas e analisadas no mesmo dia. Contudo, uma avaliação da estabilidade de ERI após o processo de extração foi realizada, através da análise de amostras preparadas no mesmo dia. As amostras foram preparadas em triplicata, nas concentrações de $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $20,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, mantidas em temperatura ambiente e foram analisadas nos tempos de 4 e 15 horas (Tabela 38).

Tabela 38. Resultados do teste de estabilidade da amostra após o processo de extração (n=3).

Amostra	Concentração média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Erro relativo (%)
Inicial	1,04	104	+4
	19,87	99,35	+ 0,65
Após 4 horas	0,98	98	2
	19,8	99	1
Após 15 horas	0,83	83	-17
	18,51	92,55	7,43

Considerando os critérios preconizados na exatidão, é possível analisar amostras processadas até 15 horas após o processo de extração.

5.2 Avaliação do método de incorporação de ERI na ração

Após a incorporação do fármaco com gelatina na ração, foram analisadas 9 amostras de ração, conforme o método analítico desenvolvido. Também foram analisadas 9 amostras de extrato fortificado e uma curva analítica em extrato fortificado (adição de ERI em matriz, após o processo de extração), para o cálculo da eficiência de incorporação. Os resultados estão apresentados na Tabela 39.

Tabela 39. Concentrações médias (n = 9) das amostras obtidas no teste de eficiência de incorporação.

Amostras	Concentração média (mg g^{-1})	CV (%)
Extrato fortificado com ERI	10,32	2,40
Ração incorporada com ERI	7,43	4,99

A eficiência de incorporação foi calculada pela razão da média das concentrações obtidas na ração incorporada com ERI pela média das concentrações obtidas na fortificação do extrato com ERI. Neste caso, a eficiência de incorporação é de 72%, ou seja, há uma perda de aproximadamente 30% durante o processo de incorporação. A perda foi considerada para correção da dose para produção das rações medicamentosas.

A homogeneidade da concentração de ERI na ração incorporada com gelatina foi avaliada pela análise de três amostras em triplicata, preparadas a partir da mesma ração. A concentração média obtida foi de $10,45 \text{ mg g}^{-1}$ e o coeficiente de variação de 2,03%. Dessa forma, a homogeneidade foi considerada satisfatória.

Outra forma de avaliar o método de incorporação do ativo na ração é através do ensaio de lixiviação. Este procedimento é fundamental para verificar se o método de incorporação

desenvolvido levará a dose correta aos peixes, sendo capaz de evitar a perda do medicamento para a água. Nesta etapa é importante verificar também a flutuabilidade da ração, que não pode ser afetada pelo método de incorporação, pois pode interferir na alimentação dos peixes. O ensaio de lixiviação foi realizado em triplicata, com a temperatura da água mantida a 27°C e agitação branda. Os resultados médios estão apresentados na Tabela 40.

Tabela 40. Resultados do ensaio de lixiviação realizado em triplicata (n = 3).

Tempo (min)	Concentração média corrigida (mg mL ⁻¹)	Lixiviação (%)	CV (%)
5	0,06541	0,65	13,30
10	0,08396	0,84	12,94
15	0,11273	1,13	25,01

A quantidade de ração utilizada em cada ensaio foi de 1,0 g, que contém 10 mg de ERI. A ração incorporada com gelatina e ERI não causou alteração na flutuabilidade e apresentou baixa lixiviação, sendo adequada para o uso nos experimentos para o tratamento dos animais.

5.3 Estudo de depleção residual

5.3.1 Condições experimentais

O estudo de depleção residual foi iniciado em dezembro de 2020, com o tratamento dos animais, e finalizado em janeiro de 2021. Antes do início do tratamento com a ração medicamentosa, os animais foram manejados para pesagem e distribuição em 11 caixas, de forma a manter o peso médio similar entre as caixas, como exibido na Tabela 41.

Tabela 41. Peso médio dos peixes e desvio padrão por caixa.

Caixa	Peso médio (g)	Desvio padrão
1	229,82	57,6
2	234,76	88,68
3	231,11	51,47
4	225,18	48,77
5	239,65	156,94
6	217,6	66,32
7	215,7	117,32
8	237,76	85,63
9	225,18	70,90
10	226,65	79,59
11	235,72	66,66

Foram preparados oito lotes de ração medicamentosa pelo método de incorporação de ERI com gelatina. Cada lote foi analisado em triplicata, conforme o método descrito no item 4.7.1. Os resultados das análises são apresentados na Tabela 42.

Tabela 42. Concentrações médias de ERI (n=3) obtidas nas análises dos lotes de ração medicamentosa produzidos.

Lote	Concentração média (ng mL ⁻¹)	Concentração correspondente (mg g ⁻¹)
1	102,76	10,28
2	98,38	9,84
3	96,89	9,69
4	100,54	10,05
5	96,44	9,64
6	105,01	10,50
7	104,38	10,44
8	97,18	9,72

As concentrações alcançadas nos lotes produzidos foram consideradas satisfatórias e a ração medicamentosa foi utilizada no experimento com os animais. Um teste de palatabilidade foi realizado antes do início do experimento, sabendo que a ERI possui sabor amargo e essa característica poderia atrapalhar o tratamento (Serdoz et al., 2011). Os animais se alimentaram da ração contendo ERI, apesar do sabor amargo. Contudo, para favorecer a alimentação, optou-se por adicionar carboximetilcelulose sódica (CMC), a fim de mascarar o sabor da ERI, atuando como palatabilizante. A CMC é um polímero derivado da celulose, solúvel em água e é uma matéria-prima aprovada pelo MAPA para uso na alimentação animal (MAPA, 2018). Foram adicionados 2 mL de CMC para cada 100 g de ração medicamentosa, pouco antes do oferecimento aos peixes. Para avaliar a possível perda do ativo após a adição do palatabilizante, foram realizadas análises em triplicata de um mesmo lote de ração, antes e depois da adição da CMC. As concentrações médias determinadas foram de 10,38 mg g⁻¹ em ração sem CMC e de 10,42 mg g⁻¹ em ração com CMC. Dessa forma, pode-se considerar que não houve variação na concentração ou perda de ERI após o procedimento.

Os resultados indicam que a adição do palatabilizante não ocasionou perda do ativo, assim o procedimento pôde ser realizado durante o experimento. Outra estratégia utilizada para garantir que os animais se alimentem da ração medicamentosa é diminuir a quantidade de ração fornecida, para que os peixes tenham fome e não recusem a ração medicamentosa (Zrnčiči, 2020). Antes do início do estudo, os animais estavam sendo alimentados com ração comercial, em quantidade equivalente a 4% do peso vivo, duas vezes ao dia. Durante o estudo, os animais foram alimentados apenas com a ração medicamentosa, com o equivalente a 1% do peso vivo, uma vez ao dia. Nas Figuras 31 e 32 a seguir são apresentadas fotografias, a primeira dos oito

lotes de ração produzidos e a segunda de rações antes e depois do processo de incorporação com gelatina, para comparação.

Figura 31. Fotografia dos 8 lotes de ração medicamentosa contendo ERI produzidos em laboratório.

Figura 32. Fotografia de ração antes (béquer do lado esquerdo) e após o procedimento de incorporação com gelatina (béquer do lado direito).

Durante a realização do estudo de depleção residual, os animais foram mantidos em caixas d'água de capacidade de 150 litros, com sistema de recirculação de água fechado, ou seja, ocorria entrada e saída de água em cada caixa, no entanto, não havia recirculação da água entre as caixas. Também havia um sistema de aeração forçada em cada caixa e os animais foram monitorados e alimentados diariamente. Os parâmetros de avaliação da qualidade da água também foram monitorados e os resultados médios estão apresentados na Tabela 43.

Tabela 43. Valores médios diários (n=4), valores médios totais e os respectivos desvios-padrão (n=40) das condições experimentais no estudo com os animais.

Dias após o tratamento	pH	Temperatura (°C)	Salinidade (ppt)	O ₂ dissolvido (mg L ⁻¹)	O ₂ dissolvido (%)	Condutividade elétrica (µS/cm)
^a	7,73	30,27	0,08	8,37	113,42	165,75
^a	7,68	30,3	0,08	8,27	209,05	165,72
^a	7,74	30,37	0,08	4,9	63,22	165,8
^a	7,74	30,6	0,08	4,1	53,1	165
1	7,73	30,75	0,09	3,9	53,35	176,12
3	7,76	31,05	0,082	10,3	136,37	165,5
5	7,79	31,17	0,08	7,8	104,75	164,9
8	7,85	30,12	0,09	5,37	72	170,9
11	6,62	30,35	0,082	6,6	88,27	168,3
20	7,97	31,12	0,082	4,37	58,17	166,32
Média total	7,66	30,61	0,083	6,4	95,17	167,43
DP	0,37	0,38	0,004	2,20	48,97	3,56

^a medidas realizadas durante o tratamento com a ração medicamentosa.

A análise da qualidade da água foi realizada antes e durante o experimento. Os valores de pH mantiveram-se estáveis, com média de 7,66, próximo a faixa de valores ideais, entre 6,5 e 7,5. A temperatura média manteve-se próxima aos 30°C, dentro da faixa de temperatura ótima para o crescimento das espécies tropicais criadas no Brasil, como o pacu, tambaqui, tilápia e tambacu. A temperatura da água influencia a temperatura interna dos peixes, sendo que um aumento da temperatura da água também eleva o metabolismo dos animais (EMBRAPA, 2000). Quanto à salinidade da água, o valor médio foi de 0,083 ppt, que corresponde a valores esperados em água doce (<0,5%). Alterações na salinidade podem se tornar um fator de estresse

e reduzir a sobrevivência e o crescimento dos animais. A condutividade elétrica está relacionada principalmente com a presença de espécies iônicas dissolvidas na água. No estudo, a condutividade média foi de 167,43 $\mu\text{S}/\text{cm}$, valores considerados na faixa ideal para sistemas de aquicultura. Sabe-se que a quantidade de O_2 dissolvido é crucial para a manutenção da vida dos organismos aquáticos. Durante o experimento, os valores de O_2 dissolvido apresentaram variações, mas as medições indicam que a quantidade está próxima ao mínimo desejável de 4,0 mg L^{-1} (Makori et al. 2017).

5.3.2 Análise das amostras e estimativa do período de carência

Os animais foram abatidos nos períodos de 1, 3, 5, 8, 11 e 15 dias (24, 72, 120, 192, 264 e 360 horas) após o término do tratamento. Os resultados das concentrações residuais de ERI obtidos a partir das análises são apresentados na Tabela 44.

Tabela 44. Resultados de concentração média (n=2) para os peixes abatidos após períodos pré-estabelecidos e analisados.

Abate	Peixe	Peso (g)	ERI concentração média ($\mu\text{g kg}^{-1}$) n=2	CV (%)	Abate	Peixe	Peso (g)	ERI concentração média ($\mu\text{g kg}^{-1}$) n=2	CV (%)
24 horas após o tratamento	1	211,4	controle	-	72 horas após o tratamento	12	374,6	controle	-
	2	384,2	4770,48	0,34		13	231,2	60,83	1,24
	3	272,2	2116,72	6,54		14	229,8	36,77	4,91
	4	140,8	5211,20	4,54		15	263,2	148,04	3,34
	5	686,5	4087,78	6,06		16	132,6	50,25	2,93
	6	281	690,88	3,51		17	225,6	25,39	8,78
	7	157	4703,59	2,94		18	422	83,42	3,08
	8	492	2290,14	0,39		19	181,8	10,31	4,06
	9	186	2621,79	5,41		20	232,4	159,82	3,78
	10	222,5	1760,60	10,77		21	295,4	34,09	4,26
	11	151	1392,91	2,27		22	192,6	48,18	2,48
120 horas após o tratamento	23	194,7	controle	-	192 horas após o tratamento	34	447	controle	-
	24	159,4	9,03	0,84		35	212,6	3,26	8,02
	25	192,7	74,28	20,78		36	172,6	3,76	8,65
	26	238,2	4,59	7,15		37	177,8	1,71	2,04
	27	198,7	23,40	1,48		38	252,8	4,93	17,74

Tabela 44. Continuação. Resultados de concentração média (=2) para os peixes abatidos após períodos pré-estabelecidos e analisados.

Abate	Peixe	Peso (g)	ERI concentração média ($\mu\text{g kg}^{-1}$) n=2	CV (%)	Abate	Peixe	Peso (g)	ERI concentração média ($\mu\text{g kg}^{-1}$) n=2	CV (%)
	28	354	3,37	4,36		39	274	5,22	1,20
	29	231	3,46	8,21		40	277,2	2,67	0,75
	30	269	6,02	3,35		41	158,8	2,76	8,65
	31	233,6	3,34	13,74		42	154,2	0,54	21,12
	32	227,2	3,64	0,17		43	405,6	2,36	2,68
	33	301,6	3,27	18,44		44	393,6	10,70	0,84
264 horas após o tratamento	45	325,4	controle	-	360 horas após o tratamento	56	183	Controle	
	46	328,8	<LQ			57	139,4	<LQ	
	47	262,1	<LQ			58	232	<LQ	
	49	240,2	<LQ			59	286,6	2,01	1,21
	49	221,1	1,34	9,92		60	180,7	<LQ	
	50	150	1,00	6,28		61	227,8	<LQ	
	51	162,2	<LQ			62	436,2	<LQ	
	52	129,8	<LQ			63	301,2	<LQ	
	53	267,6	<LQ			64	166	1,35	1,56
	54	212,2	1,22	4,07		65	179,8	<LQ	
	55	194,8	<LQ			66	211	<LQ	

Analisando os resultados na Tabela 44, é possível notar uma variação das concentrações encontradas em um mesmo tempo de abate, que pode ser explicada pela competição entre os animais pela ração fornecida, causando uma diferença na quantidade de ERI ingerida. A variação entre os pesos dos animais também pode explicar as diferenças de concentração neste caso. O peso médio dos peixes abatidos foi de 250 g, mas a faixa de peso dos animais foi de 129,8 até 686,5 g, com desvio padrão de 99,83.

O planejamento inicial do experimento incluía a análise de 10 períodos de abate após o tratamento. No entanto, em 360 horas (15 dias) após o tratamento a maior parte das amostras encontrava-se abaixo do LQ, portanto o experimento não foi prosseguido. A maioria das amostras analisadas do período de 264 horas e 360 horas após o tratamento apresentaram concentrações inferiores ao LQ ($1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) e não foram consideradas nas análises a seguir.

Os dados de concentração encontrados no estudo realizado com os animais foram analisados com o intuito de se estimar um perfil de depleção residual de ERI em pacu. Para isso, alguns modelos matemáticos foram testados, sendo que o melhor modelo não linear de ajuste obtido foi o decaimento de primeira fase, cujo gráfico é apresentado a seguir na Figura 33.

Figura 33. Gráfico representando o perfil de depleção residual de ERI.

No Brasil, o LMR definido pela ANVISA para ERI em pescados é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Brasil, 2019). Visando ilustrar melhor a depleção residual de ERI nas concentrações na faixa do LMR escolhido, a Figura 34 representa uma ampliação da região de interesse em relação ao gráfico anterior, da Figura 33.

Figura 34. Ampliação do gráfico do perfil residual de ERI para melhor visualização do comportamento da curva em relação às concentrações em torno do LMR ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Para estimar o período de carência mínimo, a FDA recomenda modelar a curva de depleção no sentido de gerar uma reta a partir da transformação dos dados de concentração em função logarítmica. Assim, procedeu-se a regressão linear da fase terminal de depleção residual de ERI a partir das concentrações obtidas transformadas pela função logarítmica neperiana (Ln), sendo o gráfico resultante apresentado na Figura 35.

Figura 35. Gráfico da regressão linear da curva de depleção residual considerando os resíduos de ERI: Limite Máximo de Resíduo (LMR = $100 \mu\text{g kg}^{-1}$; $\text{Ln}_{\text{LMR}} = 4,605$); (a): reta obtida da regressão linear; (b): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95%; (c): reta obtida com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99%; $\text{PC}_{95/95}$: Período de Carência estimado com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 95% = 151 horas; $\text{PC}_{95/99}$: Período de Carência estimado com 95% de confiança considerando o limite de tolerância de 99% = 175 horas.

As análises da regressão linear dos dados cinéticos descrevem a depleção residual, muitas vezes, permitindo a estimação do tempo necessário para que a concentração do resíduo atinja uma concentração de referência que, no presente caso, seria o LMR ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$). O período de eliminação necessário para que a concentração residual esteja abaixo do LMR é estimado considerando um limite de tolerância, o qual fornece um intervalo no qual se localiza um percentil da população com um nível de confiança. A FDA recomenda empregar 99% de percentil e 95% de confiança para essa avaliação (reta c da Figura 35). Portanto, o período de carência mínimo necessário para a concentração residual de ERI esteja abaixo do LMR, considerando 99% de percentil e 95% de confiança ($\text{PC}_{95/99}$) é de 175 horas, o que corresponderia a 7,3 dias, para o que se recomenda o arredondamento para cima até um número inteiro (8 dias). Portanto, o período mínimo estimado para a eliminação de resíduos à níveis de concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (LMR) quando do uso de ERI na dose de tratamento de 100 mg

(kgPV)⁻¹, via oral, durante um período de 7 dias consecutivos em pacu, nas condições de temperatura média de 30 °C, é de 8 dias ou de 240°C-dias.

Outros estudos avaliaram o perfil de eliminação da ERI em peixes. Phuoc et al. (2010), investigaram a acumulação e a eliminação de ERI base após administração em tilápias (*Oreochromis niloticus*) adultas. Foram realizados dois tratamentos via ração medicamentosa, de 50 e 100 mg de ERI (kgPv)⁻¹ por dia, durante 7 dias. Em temperatura média de 28°C, o período de carência após o tratamento em tilápias foi estimado em 33 dias e 42 dias, para dose de 50 e 100 mg (kgPV)⁻¹, respectivamente. É importante mencionar que o LMR considerado para ERI nesse estudo foi de 30 µg kg⁻¹, conforme a Agência Canadense de Inspeção de Alimentos. Após 23 dias do tratamento de 100 mg (kgPV)⁻¹, foi possível determinar a presença de 42,9 ± 17,4 µg kg⁻¹ de ERI nas amostras de filé de tilápia, enquanto que no presente trabalho, em carne de pacu, após 15 dias de tratamento as quantidades de ERI estavam abaixo do LQ. Essa diferença pode ser explicada pela diferença entre as espécies estudadas e pela diferença da temperatura que influencia o metabolismo dos peixes e consequentemente a metabolização do ativo. É importante o estudo do perfil de depleção de resíduos em todas as espécies para as quais há intenção de se administrar o medicamento. Phuoc et al., (2010) identificaram a presença de substâncias relacionadas nas amostras, as eritromicinas E (0,30 µg kg⁻¹) e F (1,37 µg kg⁻¹) no grupo de animais que receberam a menor dose de tratamento e também as eritromicinas C (131,5 µg kg⁻¹) e E (258,3 µg kg⁻¹) que surgiram logo após o término do tratamento. Os autores explicam que enzimas hepáticas e intestinais podem participar no metabolismo da ERI e paralelamente, a ação de enzimas hepáticas de biotransformação das tilápias também pode ser correlacionada.

Outro estudo do mesmo grupo de pesquisa (Minh; Lam; Giao, 2011) avaliou a absorção, o metabolismo e a degradação de eritromicina em camarões (*Macrobrachium rosenbergii*) e em tilápias (*Oreochromis niloticus*) após administração oral via ração medicamentosa. Foram realizados dois tratamentos para cada espécie, de 50 e 100 mg (kgPV)⁻¹, por 7 dias, como no estudo anterior. Para os camarões, apesar da concentração média de ERI ter sido menor no grupo que recebeu a menor dose de tratamento, a eliminação dos resíduos de ERI foi mais rápida no grupo que recebeu a maior dose de tratamento, atingindo rapidamente concentrações menores que 100 µg kg⁻¹, o que seria considerado um limite seguro de acordo com o FDA e a EC, mas para atender a Agência Canadense de Inspeção de Alimentos, foi recomendado um período de carência mais longo, de 35 dias. Os resultados para a tilápia foram os mesmos encontrados no estudo anterior, sendo recomendado o período de 33 dias para a dose de 50 mg

(kgPV)⁻¹ e de 42 dias para a dose de 100 mg (kgPV)⁻¹, com temperatura média de 28°C. Os autores encontraram evidências de formas biotransformadas do ativo, que sugerem ser originadas não apenas do processo de fermentação utilizado para obtenção do composto, mas também do resultado de rotas endo-enzimáticas.

A depleção residual de ERI também foi estudada em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Esposito et al., 2007). O tratamento foi realizado por administração oral do ativo via ração medicamentosa a 100 mg (kgPV)⁻¹ diariamente, durante 21 dias consecutivos, seguindo o protocolo de tratamento para doença renal bacteriana. A temperatura média da água durante o experimento foi de 11,5°C e o LMR considerado foi de 200 µg kg⁻¹. O período de carência estimado pela interpolação dos dados foi de 255°C-dias (multiplicação da temperatura média pelo número de dias), ou aproximadamente 22 dias. A eliminação dos resíduos de ERI foi relativamente rápida, no entanto, grandes diferenças como as espécies de peixes, período de tratamento e de temperatura dificultam a comparação com o presente estudo. Os autores evidenciam a importância deste antimicrobiano na medicina humana, sugerindo que o emprego na medicina veterinária deve ocorrer apenas em casos realmente necessários.

Ao analisar 4 espécies de peixes cultivados em aquicultura e obtidos comercialmente na Argentina, Griboff et al. (2020) detectaram pelo menos um antimicrobiano em cada amostra, incluindo substâncias não permitidas. A análise revelou a presença de 42 dos 46 antimicrobianos monitorados, sendo que o maior número de antimicrobianos encontrados foram em amostras de pacu. A ERI foi o macrolídeo mais frequentemente detectado, com concentrações abaixo do LMR considerado (100 µg kg⁻¹), em cerca de 85% das amostras analisadas. Os autores acreditam que o desfecho do estudo corrobora com a falta de controle do uso de antimicrobianos importantes para a saúde humana e animal ou, sugere uma contaminação dos sistemas aquáticos (Griboff et al., 2020).

Os resultados obtidos neste estudo permitiram estimar um período de carência mínimo de 8 dias a ser recomendado para ERI em carne de pacu, após a administração oral do ativo, considerando a dose de (100 mg kg PV)⁻¹ e temperatura média de 30°C, ou de 240°C-dia. Foram considerados principalmente aspectos relacionados à segurança alimentar, no entanto, o emprego de antimicrobianos na aquicultura de forma irresponsável favorece a disseminação de microrganismos resistentes à antimicrobianos, um risco para a saúde humana, animal e para o meio ambiente, que deve ser monitorado.

Nas figuras a seguir são apresentadas fotografias de etapas dos experimentos do estudo de depleção realizado no CAUNESP, em Jaboticabal, SP. Na Figura 36, uma fotografia dos animais durante a alimentação com ração medicamentosa em uma das caixas d'água no biotério; na Figura 37, um peixe em balde em imersão, contendo solução de benzocaína a 0,2 g L⁻¹ para eutanásia; enquanto que na Figura 38, a pesagem de um peixe.

Figura 36. Peixes pacu em uma das caixas d'água em biotério, durante a alimentação com ração medicamentosa.

Figura 37 . Peixe em balde contendo solução de benzocaína a $0,2 \text{ g L}^{-1}$ para eutanásia.

Figura 38. Realização de pesagem de peixe.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Um método analítico para determinação residual de ERI em carne de peixe foi desenvolvido e validado. Com a associação de duas técnicas de preparo de amostra modernas e eficientes, o QuEChERS e a DLLME, foi possível concentrar a amostra e reduzir o LQ do método. A determinação de quantidades mínimas de ERI nessa matriz complexa é de grande importância para alcançar dados satisfatórios para estimar a depleção residual do ativo e o período de carência.

A ração medicamentosa contendo ERI foi produzida e utilizada no estudo com os peixes para estimativa do perfil de depleção residual e do período de carência mínimo. O método de incorporação de ERI na ração foi avaliado e demonstrou ser adequado para o preparo da ração medicamentosa. Os procedimentos analíticos para determinação de ERI na ração foram validados e utilizados para avaliar a ração produzida para o estudo com os animais.

Com a aplicação dos métodos desenvolvidos e análise dos resultados, foi possível estimar o perfil de depleção residual de ERI em pacu e com isso estimar também o período mínimo de 10 dias para eliminação dos resíduos do ativo à níveis de concentração aceitáveis conforme o LMR definido ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$), sendo o tratamento de $100 \text{ mg (kgPV)}^{-1}$ por via oral, durante 7 dias consecutivos e com temperatura média de 30°C , ou 240°C-dia .

Referências

7 REFERÊNCIAS

- Anadón A; Reeve-Johnson L. Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomal enzymes: implications for veterinary medicine. *Research in Veterinary Science*. 1999; 66: 197-203.
- Anastassiades M et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*. 2003; 86(2): 412-31.
- Armenta S; Garrigues S; de la Guardia M. Green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*. 2008; 27(6): 497-511.
- Asati A; Satyanarayana GNV; Patel DK. Comparison of two microextraction methods based on solidification of floating organic droplet for the determination of multiclass analytes in river water samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry using central composite design. *Journal of Chromatography A*. 2017; 1513: 157-71.
- Assis GBN et al. Natural coinfection by *Streptococcus agalactiae* and *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) *Journal of Fish Diseases*. 2017; 40(1): 51-63.
- Barros Neto B; Scarminio IS; Bruns RE. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.
- Barth T et al. Extração líquido-líquido. In: Borges KB; De Figueiredo ED; Queiroz MEC. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: LTC, 2015. Capítulo 5; 30-9.
- Berendsen BJA et al. Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. *Trends in Analytical Chemistry*. 2013; 43: 229-39,
- Boobis A, et al. Characterizing chronic and acute health risks of residues of veterinary drugs in food: latest methodological developments by the joint FAO/WHO expert committee on food additives. *Critical Reviews in Toxicology*. 2017; 47(10): 889-903.
- Borges KB; Pereira AC; Mano V. Introdução ao preparo de amostras. In: Borges KB; De Figueiredo ED; Queiroz MEC. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: LTC, 2015. Capítulo 1; 2-8.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 51, de 19 de dezembro de 2019. Estabelece a lista de limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. *Diário oficial da união*. Edição 249, seção 1, p. 98. 2019b.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Guia para Validação de Métodos Analíticos. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário oficial da união*. Edição 141, seção 1, p. 87. 2017.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 328, de 19 de dezembro de 2019. Dispõe sobre a avaliação do risco à saúde humana de medicamentos veterinários e os métodos de análise para fins de avaliação da conformidade. Diário oficial da união. Edição 249, secção 1, p. 82. 2019a.

Brisaert M; Heylen M; Plaizier-Vercammen J. Investigation on the chemical stability of erythromycin in solutions using an optimization system. *Pharmacy World & Science*. 1996; 18(5): 182-6.

Busatto Z et al. 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*. 2017; 34(4): 509-19.

Cabello FC et al. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*. 2013; 15(7): 1917-42.

Campone L et al. Ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction for fast and accurate analysis of chloramphenicol in honey. *Food Research International*. 2019; 115: 572-9.

Carabajal M et al. Multivariate optimization of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of six antiparasite drugs in kennel effluent waters by using second-order chromatography data. *Talanta*. 2021; 224: 121929.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States. 2013. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention. U.S. Department of Health and Human Services, 2013.

Chen J; Wei Z; Cao X. QuEChERS pretreatment combined with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of four veterinary drug residues in marine products. *Food Analytical Methods*. 2019; 12: 1055-66.

Chen L; et al. Application of graphene-based solid-phase extraction for ultra-fast determination of malachite green and its metabolite in fish tissues. *Food Chemistry*. 2013; 141: 1383-89.

CNA, Confederação da Agricultura e Pecuária no Brasil. Doenças de animais aquáticos de importância para o Brasil: Manual de identificação no campo. Cartilhas CNA de Sanidade. 2020.

Codex Alimentarius. Maximum Residue Limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in food. 2015: FAO/WHO.

Danezis GP, et al. Multi-residue analysis of pesticides, plant hormones, veterinary drugs and mycotoxins using HILIC chromatography-MS/MS in various food matrices. *Analytica Chimica Acta*. 2016; 942: 121-38.

Dasenaki M; Thomaidis S. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2015; 880: 103-21.

De Alwis HG et al. Determination of erythromycin in medicated salmonid fish feed by liquid chromatography and UV spectroscopy. *Journal of AOAC International*. 2013; 96(6): 1233-8.

- Delatour T et al. A. Screening of veterinary drug residues in food by LC-MS/MS. Background and challenges. Food Additives & Contaminants: Part A. 2018; 35(4): 633-46.
- Di Salvo A et al. Pharmacokinetics and residue depletion of erythromycin in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases. 2013; 36: 1021-29.
- Dinos PG. The macrolide antibiotics renaissance. British Journal of Pharmacology. 2017; 174: 2967-83.
- Draisci R et al. Confirmatory method for macrolide residues in bovine tissues by micro-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 2011; 926: 97-104.
- EC, European Commission. Sante 12682/2019. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues and analysis in food and feed. 2019.
- Edder P et al. Analysis of erythromycin and oleandomycin residues in food by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. Food Additives and Contaminants. 2002; 19(3): 232-40.
- Eldar A; Ghittino C. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. Diseases of Aquatic Organisms. 1999; 36: 227-31.
- EMA, The European Medicines Agency. Committee for veterinary medicinal products – Erythromycin. 2002. [acesso em 23 março 2021. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014185.pdf
- EMA, The European Medicines Agency. Committee for veterinary medicinal products – Erythromycin. [acesso em 23 março 2021]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/erythromycin-summary-report-2-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf
- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Fogaça F. O protagonismo do Brasil na produção mundial de pescado (artigo). Brasília: 29 de junho de 2020. [acesso em 6 março 2021]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/53738345/artigo---o-protagonismo-do-brasil-na-producao-mundial-de-pescado>
- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Recomendações técnicas nº8/2000. Parâmetros ambientais e qualidade da água na piscicultura. MAPA: 2000.
- Esposito A et al. Orally administered erythromycin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): residues in edible tissues and withdrawal time. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2007; 51(3): 1043-7.
- EU, European Union. Commission implementing regulation (2021/808) of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC.

Fais AP et al. LC-MS/MS methods for sulfadimethoxine and ormetoprim analysis in feed and fish fillet and a leaching study for feed after alternative procedures for the incorporation of drugs. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2017; 34(4): 501-08.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2016.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2020.

Farzam K; Nessel TA; Quick J. Erythromycin. In: *StatPearls* [internet]. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2021.

Ferreira SLC et al. Multivariate optimization techniques in food analysis – a review. *Food Chemistry*. 2019; 273: 3-8.

Fracarolli Neto, P et al. Enamectin benzoate in tilapia: alternative method for drug incorporation into feed and associated residual depletion study. *Food Research International*. 2019; 119: 524-9.

Frenich AG et al. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2010; 661: 150-160.

Gao L et al. Multi-pharmaceuticals analysis of fish by continuous series solid-phase extraction coupled with UPLC-MS/MS. *Acta Chromatographica* (online). 2020

Gehring R; Baynes RE; Riviere JE. Application of risk assessment and management principles to the extralabel use of drugs in food-producing animals. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapy*. 2006; 29:5-14.

Ghosh C; Shinde CP; Chakraborty BS. Influence of ionization source design on matrix effects during LC-ESI-MS/MS analysis. *Journal of Chromatography B*. 2012; 893-894: 193-200.

González-Curbelo MA et al. Evolution and applications of the QuEChERS method. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015; 71: 169-85.

Griboff J et al. Multiantibiotic residues in commercial fish from Argentina. The presence of mixtures of antibiotics in edible fish, a challenge to health risk assessment. *Food Chemistry*. 2020; 332: 127380.

Grutes JV et al. Development and validation of an LC-MS/MS screening method for macrolide and quinolone residues in baby food. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 2021; 56(3): 197-211.

Guidi LR et al. Quinolones and tetracyclines in aquaculture fish by a simple and rapid LC-MS/MS method. *Food Chemistry*. 2018; 245: 1232-38.

- Guo C et al. Development of a modified QuEChERS method for the determination of veterinary antibiotics in swine manure by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2016; 1027: 110-18.
- Habibi B et al. Development and validation of a rapid HPLC method for multiresidue determination of erythromycin, clarithromycin, and azithromycin in aquaculture fish muscles. *Acta Chromatographica*. 2017; 31: 109-12.
- Hashimoto JC et al. Considerations on the use of malachite green in aquaculture and analytical aspects of determining the residues in fish: a review. *Journal of Aquatic Food Technology*. 2011; 20(3): 273-94.
- Hird SJ et al. Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of chemical contaminants in food. *Trends in Analytical Chemistry*. 2014; 59: 59-72.
- Holcapek M; Jirásko R; Líba M. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A*. 2012; 1259: 3-15.
- Horie M et al. Determination of macrolide antibiotics in meat and fish by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2003; 492: 187-97.
- Hu C et al. A review of pretreatment and analysis of macrolides in food (update since 2010). *Journal of Chromatography A*. 2020; 1634: 1-24.
- Hu F et al. Development of a modified Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe method for the determination of multi-class antimicrobials in vegetables by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2014; 1368: 52-63.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. SIDRA. Pesquisa Pecuária Municipal 2019. [acesso em 4 março de 2021]. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2019>
- Islas G et al. Dispersive solid phase extraction for the analysis of veterinary drugs applied to food samples: a review. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2017 [https://doi.org/10.1155/2017/8215271]
- Jardim ICSF. Princípios da extração em fase sólida. In: Borges KB; De Figueiredo ED; Queiroz MEC. *Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro: LTC, 2015. Capítulo 8; 62-79.
- JECFA. *Compendium of Food Additive Specifications*. 2007. Rome: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; 2007.
- Ji K et al. Risk assessment of chlortetracycline, oxytetracycline, sulfamethazine, sulfathiazole and erythromycin in aquatic environment: are the current environmental concentrations safe? *Ecotoxicology*. 2012; 21: 2031-50.
- Jia S et al. Combined application of dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplets and charged aerosol detection for the simple and sensitive quantification of macrolide antibiotics in human urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013; 86: 204-13.

- Jo MR et al. Simultaneous determination of macrolide residues in fish and shrimp by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Science and Biotechnology*. 2011; 20(3): 823-27.
- Jones OAH; Voulvoulis N; Lester JN. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research*. 2002; 36:5013-22.
- Kaneko T; Dougherty TJ; Magee TV. *Macrolide Antibiotics*. 2007. Groton: Elsevier; Pfizer Global Research and Development.
- Kang HS et al. Occurrence of veterinary drug residues in farmed fishery products in South Korea. *Food Control*. 2018; 85: 57-65.
- Kang J et al. Simultaneous determination of multi-class veterinary drug residues in different muscle tissues by modified QuEChERS combined with HPLC-MS/MS. *Journal of Analytical Methods*. 2014; 6: 6285.
- Kim Y et al. A kinetic study on the degradation of erythromycin A in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004; 271(1-2): 63-76.
- Kinsella B et al. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A*. 2009; 1216(46): 7977-8015.
- Kirst HA. Introduction to the macrolide antibiotics. In: Kirst HA; Schonfeld W. *Macrolide Antibiotics*. Verlag Basel: 2002.
- Korte R; Oberleitner D; Brockmeyer J. Determination of food allergens by LC-MS: impacts of sample preparation, food matrix, and thermal processing on peptide detectability and quantification. *Journal of Proteomics*. 2019; 196: 131-40.
- Kubitza F. Aquicultura no Brasil. *Revista Panorama da Aquicultura*. 2015; 25(150).
- Kubitza F. Aquicultura no Brasil. *Revista Panorama da Aquicultura*. 2012; 22(132): 14-23.
- Kubitza F. Manejo na produção de peixes. *Revista Panorama da Aquicultura*. 2009; 19(11): 14-27.
- Lehotay SJ; Mastovská K; Lightfield AR. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*. 2005; 88(2): 615-29.
- Li S et al. Determination of veterinary drug residues in food of animal origin: sample preparation methods and analytical techniques. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2020 [doi: 10.1080/10826076.2020.1798247].
- Li Y; Zhang J. The effect of acute erythromycin exposure on the swimming ability of zebrafish (*Danio rerio*) and Medaka (*Oryzias latipes*). *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020; 17: 3389.
- Lin Y et al. Determination of five nitroimidazole residues in artificial porcine muscle tissue samples by capillary electrophoresis. *Talanta*. 2012; 88: 646-52.

- Liu H et al. QuEChERS with magnetic hydrophilic-lipophilic balanced adsorbent and its application in multi-class veterinary residues in milk by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia*. 2018; 81: 265-75.
- Liu J et al. Modulation of erythromycin-induced biochemical responses in crucian carp by ketoconazole. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017; 24: 5285-92.
- Liu J et al. Tissue distribution, bioconcentration, metabolism, and effects of erythromycin in crucian carp (*Carassius auratus*). *Science of the Total Environment*. 2014; 490: 914-920.
- Lombardo-Agüi M et al. Determination of quinolones of veterinary use in bee products by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a QuEChERS extraction procedure. *Talanta*. 2012; 93: 193-99.
- Lopes RP et al. Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2012; 895-6: 39-47.
- Lozano I et al. Antibiotics in Chilean Aquaculture: A Review in Antibiotic Use in Animals. Sara Savic, IntechOpen: 2017.
- Lucchetti D et al. Simple confirmatory method for the determination of erythromycin residues in trout: a fast liquid-liquid extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53: 9689-94.
- Lulijwa R; Rupia EJ; Alfaro AC. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Reviews in Aquaculture*. 2020; 12: 640-63.
- Makori AJ et al. Effects of water physico-chemical parameters on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth in earthen ponds in Teso North Sub-Country, Busia County. *Fisheries and Aquatic Sciences*. 2017; 20:30.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aquicultura com sanidade: programa nacional de sanidade de animais aquáticos de cultivo. Brasília: 2020, MAPA.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia: Validação e Controle de Qualidade Analítica Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários. Brasília: MAPA, 2011.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa número 26 (IN nº 26) de 09 de julho de 2009. Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. 2009. [acesso em 23 junho 2021]. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-26-de-9-de-julho-de-2009.pdf/view>
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Matérias primas aprovadas pelo MAPA para uso na alimentação animal. 2018. [acesso em 5 abril 2021]. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/MatriasprimasaprovadasPortal.pdf>

- Marazuela MD, Bogialli S. A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. *Analytica Chimica Acta*. 2009; 645: 5-17.
- Masiá A et al. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2016; 936: 40-61.
- Maštovská K; Lehotay SJ. Evaluation of common organic solvents for gas chromatography analysis and stability of multiclass pesticide residues. *Journal of Chromatography A*. 2004; 1040: 259-72.
- Minh NP; Lam TB; Giao NT. Simultaneous determination of Erythromycin A in giant prawn and Tilapia in Mekong Region by stripping square wave voltammetry. *European Journal of Food Research & Review*. 2011; 1(1):1-14.
- Minh NP; Lam TB; Trang TTD. Adsorption, metabolism and degradation of erythromycin in giant freshwater prawn and tilapia in Mekong River Delta. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2010; 9(10): 935-41.
- OIE – World Organisation for Animal Health. One Health. [acesso em 10 de março 2021]. Disponível em: <https://www.oie.int/en/what-we-do/global-initiatives/one-health/>
- Orlando EA et al. UPLC-MS/MS determination of florfenicol and florfenicol amine antimicrobial residues in tilapia muscle. *Journal of Chromatography B*. 2016; 1035: 8-15.
- Ötles S; Kartal C. Solid-phase extraction (SPE): principles and applications in food samples. *Acta Scientiarum Pononorum*. 2016; 15(1): 5-15.
- Park MJ et al. A new analytical method for erythromycin in fish by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Science and Biotechnology*. 2008; 17(3): 508-513.
- Paschoal JAR, et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*. 2008; 31(5): 1190-98.
- Pereira BFM et al. Determination of macrolide antimicrobials in infant formulas using a modified alkaline QuEChERS and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Food Analytical Methods*. 2021; 14(4); 1-15.
- Pereira Filho, ER. Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados. São Carlos: UFSCar, 2018. 83p.
- Perestrelo R. et al. QuEChERS – Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Analytica Chimica Acta*. 2019; 1070: 1-28.
- Pérez MLG et al. Analysis of veterinary drug residues in cheese by ultra-performance LC coupled to triple quadrupole MS/MS. *Journal of Separation Science*. 2013; 36: 1223-30.
- Phuoc N et al. Accumulation and clearance of orally administered erythromycin in adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *African Journal of Food Science*. 2010; 4(9): 591-6.

- Pierpaolo T. Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LC-MS based methods, *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2017; 34(5): 766-84.
- Portela ACV et al. Food safety evaluation for the use of albendazole in fish: residual depletion profile and withdrawal period estimation. *Food Additives and Contaminants: Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*. 2020; 37(4): 596-606.
- Prescott JF. History of antimicrobial usage in agriculture: an overview. In *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Washington: 2006; ASM Press.
- Quesada SP; Paschoal JAR; Reyes FGR. Considerations on the Aquaculture Development and on the Use of Veterinary Drugs: Special Issue for Fluoroquinolones – a Review. *Journal of Food Science*. 2013;78(9): 1321-33.
- Quigley A; Cummins W; Connolly D. Dispersive liquid-liquid microextraction in the analysis of milk and dairy products: a review. *Journal of Chemistry*. 2016: 1-12.
- Rezaee M et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2006; 1116: 1-9.
- Rezaee M; Yamini Y; Faraji M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A*. 2010; 1217(16) 2341-57.
- Rico A et al. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review. *Reviews in Aquaculture*. 2012; 4:75-93.
- Ridgway K; Lalljie SPD; Smith RM. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*. 2007; 1153: 36-53.
- Rocca LM, et al. Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LC-MS based methods. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2017; 34(5): 766-84.
- Rodrigues S et al. Acute and chronic effects of erythromycin exposure on oxidative stress and genotoxicity parameters of *Oncorhynchus mykiss*. *Science of the Total Environment*. 2016; 545-546: 591-600.
- Rodrigues S et al. Assessment of toxic effects of the antibiotic erythromycin on the marine fish gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by a multi-biomarker approach. *Chemosphere*. 2019b; 216: 234-47.
- Rodrigues S et al. Histopathological effects of the antibiotic erythromycin on the freshwater fish species *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019a; 181: 1-10.
- Rúbies A et al. Determination of avermectins: a QuEChERS approach to the analysis of food samples. *Food Chemistry*. 2015; 181: 57-63.
- Salvador R et al. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. Group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the north region of Parana State, Brazil. *Ciência Rural*. 2005; 35(6): 1374-8.

- Santana-Mayor A et al. Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2019; 116: 214-35.
- Santos L; Ramos F. Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2018; 52: 135-43.
- Santos MG; Figueiredo EC. Preparo de amostras empregando polímeros de impressão molecular. In: Borges KB; De Figueiredo ED; Queiroz MEC. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: LTC, 2015. Capítulo 10; 88-96.
- Sebastião F et al. Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. *Advances in Microbiology*. 2015; 409-24.
- Serdoz F et al. Development and pharmacokinetic evaluation of erythromycin lipidic formulations for oral administration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011; 78: 401-7.
- Sereshti H et al. Dispersive liquid-liquid microextraction based on hydrophobic deep eutectic solvents: application for tetracyclines monitoring in milk. *Microchemical Journal*. 2020; 158: 105269.
- SINDAN, Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Compêndio de Produtos Veterinários [acesso em 23 junho 2021]. Disponível em: <https://sistemas.sindan.org.br/cpvs/>
- Siqueira SRR et al. A high-throughput method for determining chloramphenicol residues in poultry, egg, shrimp, fish, swine and bovine using LC-ESI-MS/MS. *Journal of Separation Science*. 2009; 32: 4012-19.
- Sismotto M et al. A simple liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight mass spectrometry method for macrolide determination in tilapia fillets. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2014; 34: 153-62.
- Sismotto M; Paschoal JAR; Reyes FG. Aspectos analíticos e regulatórios na determinação de resíduos de macrolídeos em alimentos de origem animal por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas. *Química Nova*. 2013; 36(3): 449-61.
- Stentiford GD et al. Sustainable aquaculture through the One Health lens. *Nature Food*. 2020; 1: 468-74.
- Tang YY et al. Development of a quantitative multi-class method for 18 antibiotics in chicken, pig, and fish muscle using UPLC-MS/MS. *Food Analytical Methods*. 2012; 5: 1459-68.
- Tian H et al. Quantitative multiresidue analysis of antibiotics in milk and milk powder powered by ultra-performance liquid chromatography couples to tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2016; 1033-1034: 172-79.
- Trufelli H et al. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 2020; 30(3): 491-509.
- Vardali SC; Samanidou VF; Kotzamanis YP. Development and validation of an ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time of flight-mass spectrometry (in MS^E

mode) method for the quantitative determination of 20 antimicrobial residues in edible muscle tissue of European sea bass. *Journal of Chromatography A*. 2018; 1575: 40-8.

Vázquez-Laslop N; Mankin AS. How Macrolide Antibiotics Work. *Trends in Biochemical Science*. 2018; 43(9): 668-84.

Vendrell et al. Accumulation and depletion kinetics of erythromycin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Preventive Veterinary Medicine*. 2012; 105: 160-3.

VICH GL48. Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: Marker-residue-depletion studies to establish product withdrawal periods. EMA: 2015.

VICH GL49: Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in human food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies. EMA: 2015.

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

Viñas P et al. Dispersive liquid-liquid microextraction in food analysis. A critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014; 406: 2067-99.

Wang B, Xie K, & Lee K. Veterinary drug residues in animal-derived foods: sample preparation and analytical methods. *Foods*. 2021; 10(55).

Wu J et al. Application of graphene-based solid-phase extraction coupled with ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of macrolides in fish tissues. *Food Analytical Methods*. 2013; 6(5): 1448-57.

Zanella R et al. Microextração líquido-líquido dispersiva. In: Borges KB; De Figueiredo ED; Queiroz MEC. *Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro: LTC, 2015b. Capítulo 14; 125-41.

Zanella R et al. QuEChERS. In: Borges KB; De Figueiredo ED; Queiroz MEC. *Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro: LTC, 2015. Capítulo 24; 231-44.

Zhang C et al. The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: a review. *Trends in Analytical Chemistry*. 2019; 118: 517-37.

Zhang L et al. A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. *Central European Journal of Chemistry*. 2012; 10(3): 900-25.

Zhao L et al. Occurrence of erythromycin and its degradation products residues in honey. Validation of an analytical method. *Journal of Separation Science*. 2017; 40: 1353-60.

Zhou W; Yang S; Wang PG. Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis*. 2017; 9(23): 1839-44.

Zrnčići S. Correct diagnostics: prerequisite for prudent and responsible antimicrobial administration. Asian Fisheries Science. 2020; 33: 27-32.

Zuanazzi JSG et al. Determinação da composição centesimal de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) cultivados em tanques-rede no Pantanal. 6º simpósio sobre recursos naturais e socioeconômicos do Pantanal. 2013.

Appendices

8 APÊNDICES

1. Cromatograma da solução diluente ampliado, obtido no modo MRM na transição de quantificação de ERI.

2. Cromatograma de ERI e ERI-d6 (padrão interno) em matriz obtidos no modo MRM nas transições de quantificação de ERI (734>158) e de ERI-d6 (741>164).

Anexos

9 ANEXOS

ANEXO 1. Cópia do certificado de aprovação fornecido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESP, para realização dos experimentos com animais.

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

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Eritromicina na aquicultura: estudos de incorporação do fármaco na ração e de depleção residual em peixe**", protocolo nº 016795/19, sob a responsabilidade da Profª Drª Fabiana Pilarski, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 18 de dezembro de 2019.

Vigência do Projeto	10/02/2020 a 01/07/2020
Espécie / Linhagem	<i>Piaractus mesopotamicus</i> (Pacu)
Nº de animais	200 animais
Peso / Idade	300g
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Piscicultor comercial

Jaboticabal, 18 de dezembro de 2019.

Profª Drª Paola Castro Moraes
Vice-Coordenadora – CEUA

ANEXO 2. Desenvolvimento de nanocápsulas contendo ERI para incorporação em ração.

Como alternativa para a incorporação de ERI na ração, um método baseado no emprego de nanopartículas poliméricas está em desenvolvimento. Para isso, contamos com a colaboração da professora Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari, coordenadora do Laboratório de Nanobiotecnologia, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Devido à instabilidade da ERI em meio ácido e também ao seu sabor amargo que pode conferir baixa palatabilidade aos peixes, optou-se pelo desenvolvimento de nanopartículas para incorporação de ERI na ração. A encapsulação da ERI pode diminuir o sabor amargo do ativo, enquanto que o polímero Eudragit®S100 escolhido é gastrorresistente e poderá evitar a degradação do ativo em contato com o pH ácido do estômago, liberando o fármaco apenas em pH alcalino, no intestino.

As nanopartículas poliméricas foram produzidas pela técnica de nanoprecipitação (Fessi et al., 1989; Crucho; Barros, 2017). Este processo consiste em adicionar a fase orgânica que contém o polímero, o fármaco dissolvido ou disperso em um óleo e um solvente miscível em água na fase aquosa, composta por água ultrapurificada e tensoativo, sob agitação. A formulação é agitada durante 24 horas para evaporação do solvente. O método utiliza solventes miscíveis em água e é mais adequado para o encapsulamento de fármacos lipofílicos. Além de utilizar solventes orgânicos menos tóxicos, a velocidade de agitação necessária é baixa e é possível produzir partículas em escala nanométrica.

As nanocápsulas contém um núcleo oleoso, no qual o ativo é dissolvido ou disperso neste óleo (Fonseca-Santos; Gremião; Chorilli, 2015). Diferentes óleos inertes foram testados para compor a formulação das nanocápsulas de ERI, entre eles o óleo de coco, ácido oleico, triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, migliol e o óleo volátil de *Copaifera reticulada*. A solubilidade da ERI nos óleos foi avaliada pela técnica de microscopia de luz polarizada. Os óleos de *Copaifera reticulada* e calêndula apresentaram melhor resultado visual. O óleo de *Copaifera* foi escolhido pela possibilidade de ação sinérgica com a ERI. As imagens obtidas através da microscopia de luz polarizada indicam que o ativo se encontra disperso e não dissolvido no óleo, como mostra a Figura 1.

Figura 1. Microscopia de luz polarizada de (A) Eritromicina em pó, aumento de 10 vezes (B) Eritromicina dispersa em etanol, aumento de 20 vezes e (C) Eritromicina dispersa em óleo de Copaífera, aumento de 10 vezes.

Para a produção de nanocápsulas de ERI, utilizamos o polímero Eudragit®S100, óleo volátil de *Copaífera reticulada* e etanol como fase orgânica. Já na fase aquosa, o tensoativo utilizado foi o Tween®80 (polissorbato 80).

Para avaliar a estabilidade das partículas, foram produzidas inicialmente duas formulações de 40 mL, uma formulação branca (NC branca, sem o ativo ERI) e outra contendo o ativo (NC ERI). Os parâmetros de diâmetro hidrodinâmico médio, PDI e potencial zeta foram avaliados para as duas formulações, após 24 horas, 7 dias e 14 dias. As médias dos resultados obtidos (n = 3) estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados obtidos em análises de DLS para formulações de nanocápsulas.

Formulação	Período	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NC branca	24 horas	270	0,172	- 0,493
	7 dias	279	0,160	- 0,084
	14 dias	253	0,169	- 0,162
NC ERI	24 horas	230	0,041	0,106
	7 dias	240	0,071	- 0,580
	14 dias	237	0,101	0,348

As nanopartículas foram analisadas através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering – DLS*) para se obter o diâmetro hidrodinâmico médio, o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta, que são avaliados periodicamente para o estudo de estabilidade das partículas. Também foram realizadas análises de conteúdo total, eficiência de incorporação pelo método indireto e testes iniciais de liofilização das nanopartículas.

As formulações de nanopartículas foram mantidas em temperatura refrigerada (8°C) por 14 dias, um período adequado para o preparo da ração e para o tratamento dos peixes. As análises de DLS apresentaram valores satisfatórios quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, visto que o objetivo é a obtenção de nanopartículas e quanto ao índice de polidispersão, que indicam que a população é quase monodispersa ou com baixa polidispersão.

As análises preliminares de eficiência de encapsulação pelo método indireto indicam que cerca de 89% do ativo foi encapsulado. O conteúdo total também foi determinado em diferentes períodos para avaliar se a ERI poderia degradar na formulação. Os resultados iniciais indicam que não há degradação entre os 7 primeiros dias após a produção da dispersão, mas após este período ocorre perda gradual do ativo, provavelmente devido à instabilidade em meio

aquoso. Para facilitar a incorporação na ração, uma possível abordagem consiste em secar as partículas e preparar uma suspensão em gelatina com as nanopartículas secas, semelhante ao processo já desenvolvido para o ativo não encapsulado. Experimentos de secagem das nanopartículas por liofilização foram iniciados, utilizando manitol como agente crioprotetor, em diferentes concentrações (entre 5 e 10%). No entanto, será necessário verificar o uso de outros agentes crioprotetores, visto que com o manitol nas concentrações testadas não foi capaz de evitar a aglomeração das nanopartículas.

Referências

Crucho, CIC; Barros MT. Polymeric nanoparticles: A study on the preparations variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering C*. 2017; 80: 771-4.

Fessi H et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989; 55(1):R1-R4.

Fonseca-Santos B; Gremião MPD; Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. *International Journal of Medicine*. 2015; 10: 4981-5003.

A obtenção, o transporte e a investigação científica das resinas de copaífera, incluindo oleoresinas comerciais foram autorizadas por agências governamentais brasileiras através dos documentos SISBIO nº 35143-1 e CGEN nº 010225/2014-5.