



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**LETÍCIA SAYURI SHIROMA**

**“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE FLORFENICOL E SEU METABÓLITO EM TILÁPIA POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL: APLICAÇÃO EM ENSAIOS DE BIOCONCENTRAÇÃO”**

**CAMPINAS**

**2019**

**LETÍCIA SAYURI SHIROMA**

**“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE FLORFENICOL E SEU METABÓLITO EM TILÁPIA POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL: APLICAÇÃO EM ENSAIOS DE BIOCONCENTRAÇÃO”**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Química na área de Química Analítica.**

**Orientadora: Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli**

**Coorientadora: Dra. Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz**

**O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Letícia Sayuri Shiroma e orientada pela Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli.**

**CAMPINAS**

**2019**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

Sh66d Shiroma, Leticia Sayuri, 1992-  
Desenvolvimento e validação de método para determinação de florfenicol e seu metabólito em tilápia por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial : aplicação em ensaios de bioconcentração / Leticia Sayuri Shiroma. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Carla Beatriz Grespan Bottoli.  
Coorientador: Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Cromatografia líquida. 2. Espectrometria de massa. 3. Florfenicol. 4. Tilápia (Peixe). I. Bottoli, Carla Beatriz Grespan, 1973-. II. Queiroz, Sonia Claudia do Nascimento de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Development and validation of a method for florfenicol and its metabolite determination in tilapia by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry : application in bioconcentration tests

**Palavras-chave em inglês:**

Liquid chromatography

Mass spectrometry

Florfenicol

Tilapia

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Mestra em Química na área de Química Analítica

**Banca examinadora:**

Carla Beatriz Grespan Bottoli [Orientador]

Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Maria Eugênia Queiroz Nassur

**Data de defesa:** 26-02-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Química

## **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli

Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (UNICAMP)

Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur (FFCLRP/USP)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **Letícia Sayuri Shiroma**, aprovada pela Comissão Julgadora em 26 de Fevereiro de 2019.

## DEDICATÓRIA

*A Jesus, autor e consumidor da minha fé,  
a minha mãe Tereza Shiroma e a minha família,  
às orientadoras, aos amigos e colegas de trabalho,  
Dedico esta dissertação.*

*“Os céus declaram a glória de Deus;  
o firmamento proclama a obra das Suas mãos.” (Salmos 19:1)*

*“Muitos são os planos no coração do homem,  
mas o que prevalece é o propósito do Senhor.” (Provérbios 19:21)*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Jesus, por Seu amor incondicional e pela Salvação por Ele concedida para que eu pudesse realizar este trabalho, que dedico para Sua honra e glória. Agradeço por todo o cuidado, sabedoria, provisão, refúgio, força e saúde.

A minha família, mãe Tereza, tia Maria (em memória), primo Leandro, tio Pérsio e tio Nelson e todos os tios e primos, em especial a minha mãe, que sempre acreditou em mim e me incentivou a estudar e seguir meus sonhos, me ajudando e me apoiando em todas as minhas decisões.

A minha professora e orientadora Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli e co-orientadora Dra. Sonia Cláudia do Nascimento de Queiroz e ao Dr. Claudio Martin Jonsson pelos ensinamentos, contribuições, sugestões no desenvolvimento deste trabalho, pela paciência e confiança.

Aos professores que aceitaram participar da banca de defesa de mestrado e aos suplentes.

À Unicamp e ao Instituto de Química pela oportunidade, aos funcionários e alunos, por auxiliarem e ajudarem nas dúvidas. À técnica Lucília Vilela de Melo e a todos os alunos do NovaCrom e LabFarqui, pelo companheirismo e trabalho em equipe, por toda a ajuda e sugestões, em especial aos alunos Fabi, Gabi, Hery, Igor, Jucelio, Licarion, Luciana e Marcella, pelo companheirismo.

À EMBRAPA Meio Ambiente pela colaboração e infra-estrutura para a realização desse trabalho. Aos funcionários do LRC, Débora, Maria, Márcia Assalin, Márcia Godoy, Marley, Rosangela, do LEA, Ana Lúcia, Gino e Marisa e do LEB, Henrique e Rodrigo e aos alunos da EMBRAPA, em especial à Elaine, Giovanni, Isabela, Israel, Jordana, Julyenne, Lari, Lucas e Michelly pelo auxílio com os ensaios experimentais e pela amizade.

À Elizabete Bonifácio e Andrea Espírito Santo, que me aconselham na fé sempre com amor e paciência. Aos amigos da igreja e ABU, Acson, Alaíde, Bruna, Érika, Filipe, Hellen, Karina, Luísa, Maria Tereza, Marinelli, Nayara e Rúbia. Aos amigos Ana Cláudia, Andreia, Anna, Camila, Carol, Daiane, Eveline, Fernando, Lidiane, Lívia, Maria Rosa e Nathália, pelos momentos de estudos juntos e pelas saídas e momentos de descontração.

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

Agradeço pelo apoio financeiro ao BNDES (0117020010606007) e INCT Bioanalítica.

Agradeço ao apoio da FAPESP (2014/50867-3).

Agradeço ao apoio do CNPq (311671/2015-2; 465389/2014-7).

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

Meu muito obrigada.

## RESUMO

A busca por alimentos mais saudáveis e com alto valor nutritivo gerou um aumento na produção de pescado. Para atender essa demanda, surgiu o cultivo intensivo. Porém, nesse sistema de produção há uma maior ocorrência de infecções, pois a alta densidade populacional de peixes resulta em má qualidade da água, maior acúmulo de resíduos orgânicos e nutrição insuficiente dos peixes. Para controlar essas infecções, são administrados os antibióticos. Entretanto, o uso indiscriminado dessas substâncias pode favorecer a resistência de bactérias, diminuindo a eficiência nos tratamentos e causando infecções mais severas nos seres humanos. Neste trabalho, foi desenvolvido e validado um método analítico para determinação do antibiótico veterinário florfenicol (FF) e seu metabólito florfenicol amina (FFA) em músculos de tilápias (*Oreochromis niloticus*), por esta ser a espécie de peixe mais produzida no Brasil e possuir grande interesse econômico. O florfenicol foi estudado por ser um dos únicos antibióticos permitidos pela legislação no país. Foram testadas três técnicas de extração, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), a sub-zero e o QuEChERS, das quais as mais promissoras foram o QuEChERS modificado e o QuEChERS modificado acetato, ambas utilizando 1,0 g de amostra e C<sub>18</sub> no *clean-up*. O método QuEChERS modificado foi validado e mostrou-se eficaz em termos de seletividade, linearidade, com efeito matriz de -28% e -45%, recuperação de 70 a 79% e 62 a 69%, LD de 0,025 µg mL<sup>-1</sup> e 0,05 µg mL<sup>-1</sup> e LQ de 0,05 µg mL<sup>-1</sup> e 0,10 µg mL<sup>-1</sup>, que foram menores do que o limite máximo de resíduos, para o FF e FFA, respectivamente, CC<sub>α</sub> de 1183 µg kg<sup>-1</sup>, CC<sub>β</sub> de 1365 µg kg<sup>-1</sup> e precisão com coeficientes de variação menores que 20%. Esse método apresentou facilidade de execução no preparo da amostra, devido a uma simples extração/*clean up*, com rapidez de análise, baixo consumo de solvente orgânico, além de baixa geração de resíduos, em consonância com os princípios da química verde. O método validado foi aplicado para a quantificação do florfenicol e seu metabólito em amostras de tilápias, provenientes de ensaios de bioconcentração para determinação do fator de bioconcentração e do período de depleção do florfenicol, para aplicação em protocolos de transporte de peixes. Os resultados obtidos mostraram rápida absorção e eliminação do fármaco, com baixo potencial de acúmulo do florfenicol no músculo de tilápia.

## ABSTRACT

The demand for healthier foods with high nutritional value has resulted in an increase in fish production. Attending this demand intensive cultivation has emerged. But in this production system, a high incidence of infection occurs as the high populational density results in poor water quality, major accumulation of organic wastes and insufficient nutrition of the fish. To control these infections, antibiotics are administrated. However, the indiscriminate use of these substances can favor bacterial resistance, reducing the effectiveness of the treatments and causing severe infections in humans. In this work an analytical method for the determination of the veterinary drug florfenicol (FF) and its metabolite florfenicol amine (FFA) in muscles of tilapia (*Oreochromis niloticus*), the most produced fish species in Brazil with a big economic interest, was developed and validated. Florfenicol was studied because it one of the only antibiotics allowed in Brazil. Three extraction techniques, dispersive liquid-liquid microextraction, subzero extraction and QuEChERS. The most promising were modified QuEChERS and modified acetate QuEChERS, using 1.0 g of sample and C<sub>18</sub> for clean-up. The modified QuEChERS method was validated and was effective for FF and FFA, respectively, in terms of selectivity, linearity, matrix effect of -28% and -45%, recovery of 70 to 79% and 62 to 69%, limit of detection of 0,025 µg mL<sup>-1</sup> and 0,05 µg mL<sup>-1</sup>, and limit of quantification of 0,05 µg mL<sup>-1</sup> and 0,10 µg mL<sup>-1</sup>, which were lower than maximum residue limit. CC<sub>α</sub> was 1183 µg kg<sup>-1</sup>, CC<sub>β</sub> was 1365 µg kg<sup>-1</sup> and precision had coefficients of variation lower than 20%. This method presented ease of execution using a simple extraction/clean-up with rapid analysis and low organic solvent consumption, besides low generation of residues, in line with the principles of green chemistry. The validated method was applied for quantification of florfenicol and its metabolite in tilapia samples from bioconcentration essays to determine the bioconcentration factor and withdraw period of florfenicol, for application in fish transport protocols. The results showed rapid absorption and elimination of drug, with low potential for accumulation of florfenicol in tilapia muscle.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Produção de peixes no Brasil [7].....	21
<b>Figura 2.</b> Tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ). .....	22
<b>Figura 3. (a)</b> Peixe sadio e <b>(b)</b> Peixes com infecção. ....	23
<b>Figura 4.</b> Processos de bioconcentração e de bioacumulação de compostos no meio aquático.....	25
<b>Figura 5.</b> Esquema das etapas envolvidas na extração por DLLME .....	33
<b>Figura 6.</b> Esquema de uma fonte de ionização por eletronebulização .....	37
<b>Figura 7.</b> Esquema de um analisador de massas ion-trap .....	38
<b>Figura 8.</b> Fases estacionárias: <b>(a)</b> C <sub>8</sub> HPLC Cartridge Purospher Star, Merck; <b>(b)</b> XTerra RP <sub>18</sub> , Waters; <b>(c)</b> Zorbax Eclipse XDB-C <sub>18</sub> , Agilent.....	48
<b>Figura 9.</b> Pico cromatográfico dividido em a e b a 10% da altura de pico para cálculo do fator de assimetria.....	49
<b>Figura 10.</b> Extração do FF e do FFA do músculo de tilápia por DLLME.....	52
<b>Figura 11.</b> Extração do FF e FFA do músculo de tilápia por DLLME variando o solvente dispersor entre acetona e acetonitrila. ....	53
<b>Figura 12.</b> Extração do FF e FFA do músculo de tilápia por DLLME variando o solvente extrator entre clorofórmio e diclorometano e com adição de C <sub>18</sub> na pré-extração.....	54
<b>Figura 13.</b> Extração do florfenicol do músculo de tilápia por QuEChERS .....	55
<b>Figura 14.</b> Extração do FF e FFA do músculo de tilápia pela extração sub-zero e por QuEChERS_1.....	56
<b>Figura 15.</b> Extração do FF e FFA do músculo de tilápia por QuEChERS_2, QuEChERS_3 QuEChERS_4, variando os sorventes entre C <sub>18</sub> e PSA.....	58
<b>Figura 16.</b> Ensaios de bioconcentração .....	65
<b>Figura 17. (a)</b> Espectro de massas no modo negativo da infusão direta do florfenicol 1 µg mL <sup>-1</sup> em acetonitrila fortificado com ácido fórmico 0,1%; <b>(b)</b> Espectro de massas no modo positivo da infusão direta do florfenicol amina 1 µg mL <sup>-1</sup> em acetonitrila fortificado com ácido fórmico 0,1%.....	68
<b>Figura 18.</b> Cromatogramas obtidos utilizando a coluna Lichrocart C <sub>8</sub> .....	69
<b>Figura 19.</b> Cromatogramas obtidos utilizando a coluna XTerra RP <sub>18</sub> .....	70
<b>Figura 20.</b> Cromatogramas obtidos utilizando a coluna Zorbax Eclipse XDB-C <sub>18</sub> ....	70

<b>Figura 21.</b> Cromatograma obtido utilizando a coluna Lichrocart C <sub>8</sub> HPLC Cartridge Purospher Star, Merck, 4,6 x 250 mm, d.p. 5 µm em eluição isocrática .....	71
<b>Figura 22.</b> Curvas analíticas do florfenicol (m/z 335,8) na concentração 1 µg mL <sup>-1</sup> para avaliação do volume de injeção .....	72
<b>Figura 23.</b> Valores de recuperação do florfenicol e florfenicol amina obtidos após diferentes extrações testadas na matriz de músculo de tilápia fortificado no LMR (n=3).....	73
<b>Figura 24.</b> Valores de recuperação do florfenicol e florfenicol amina 1 µg mL <sup>-1</sup> obtidos por DLLME com clorofórmio como solvente extrator (n=3).....	75
<b>Figura 25.</b> Cromatogramas e espectros de massas para o florfenicol e florfenicol amina extraídos por QuEChERS modificado da matriz de músculo de tilápia fortificada com 2,00 µg g <sup>-1</sup> .....	76
<b>Figura 26.</b> Cromatogramas do extrato da matriz de músculo de tilápia para avaliação da seletividade .....	78
<b>Figura 27.</b> Curvas analíticas e gráfico de resíduos do florfenicol nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00 µg mL <sup>-1</sup> em <b>(a)</b> fase móvel; <b>(b)</b> extrato da matriz de músculo de tilápia; <b>(c)</b> na matriz de músculo de tilápia .....	79
<b>Figura 28.</b> Curvas analíticas e gráfico de resíduos do florfenicol amina nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00 µg mL <sup>-1</sup> em (a) fase móvel; (b) extrato da matriz de músculo de tilápia; (c) na matriz de músculo de tilápia.....	80
<b>Figura 29.</b> Interpretação dos resultados do CC <sub>α</sub> e CC <sub>β</sub> . .....	82
<b>Figura 30.</b> Gráfico da concentração do florfenicol no músculo de tilápia nos tempos de 0; 1,5; 3; 6; 24 e 48 h de exposição (n=5 peixes).....	84
<b>Figura 31.</b> Gráfico da concentração do florfenicol no músculo de tilápia nos tempos de 1,5; 3; 6; 24; 48 e 120 h de depuração (n=5 peixes).....	85
<b>Figura 32.</b> Valores de log da concentração de florfenicol em músculo de tilápia na fase de depuração ao fármaco em relação ao tempo (n=5 peixes) .....	86
<b>Figura 33.</b> Relação entre os valores de concentração de florfenicol em músculo de <i>O. niloticus</i> na fase de exposição ao fármaco e valores de $1 - e^{-k_2t}$ nos diferentes períodos (t) desta fase .....	87
<b>Figura 34.</b> Gráfico da concentração do florfenicol em músculo de <i>O. niloticus</i> no tempo em que o limite de tolerância 99% (superior unicaudal, 95% de confiança) é inferior ao LMR, após a exposição ao antibiótico na água na concentração de 10 µg mL <sup>-1</sup> por 48 h. (período de depleção = 1,8 h) .....	91

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estruturas químicas e propriedades físico-químicas do florfenicol e do florfenicol amina. ....	26
<b>Tabela 2.</b> Técnicas de extração de florfenicol e florfenicol amina em peixes .....	34
<b>Tabela 3.</b> Determinação da estabilidade de uma substância em solução .....	59
<b>Tabela 4.</b> Resultado do teste de hipótese para resíduos e contaminantes e a presença de falsos positivo e negativo.....	64
<b>Tabela 5.</b> Íons e fragmentos monitorados do florfenicol e do florfenicol amina .....	69
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros cromatográficos obtidos na determinação do FF e FFA.....	72
<b>Tabela 7.</b> Valores de $F_{crit}$ , $F_{calculado}$ , $t_{crit}$ e $t_{calculado}$ para estudo do efeito matriz.....	77
<b>Tabela 8.</b> Curvas analíticas no extrato e na matriz branco fortificada com florfenicol e florfenicol amina nos três dias .....	81
<b>Tabela 9.</b> Exatidão e de precisão intradia e interdia para o florfenicol e o florfenicol amina .....	81
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros cinéticos calculados para florfenicol em músculo de <i>O. niloticus</i> .....	88
<b>Tabela 11.</b> Comparação de valores de fatores de bioconcentração de diferentes compostos e espécies.....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ACN:** Acetonitrila

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**C<sub>18</sub>:** Octadecil

**CC<sub>α</sub>:** Limite de decisão

**CC<sub>β</sub>:** Capacidade de detecção

**CEUA:** Comitê de Ética no Uso de Animais

**CODEX ALIMENTARIUS:** *Codex Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling*

**CV:** Coeficiente de variação

**DLLME:** *Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction* (Microextração Líquido-Líquido Dispersiva)

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DMF:** Dimetilformamida

**DP:** Desvio padrão

**DPX:** *Disposable Pipette Extraction* (Extração em ponteiros descartáveis)

**EC:** *European Commission* (Comunidade Europeia)

**ESI:** *Electrospray Ionization* (Ionização por eletronebulização)

**FAO:** *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)

**FDA:** *Food and Drug Administration* (Administração de Drogas e Alimentos)

**FF:** Florfenicol

**FFA:** Florfenicol amina

**HPLC:** *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

**IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**INMETRO:** Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

**LC-MS/MS:** *Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial)

**LLE:** *Liquid-Liquid Extraction* (Extração Líquido-Líquido)

**LMR:** Limite Máximo de Resíduo

**LD:** Limite de detecção

**LQ:** Limite de quantificação

**MAPA:** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

**MEPS:** *Microextraction by Packed Sorbent* (Microextração em Sorvente Empacotado)

**MMQO:** Método dos Mínimos Quadrados Ordinários

**MSPD:** *Matrix Solid Phase Dispersion* (Dispersão de Matriz em Fase Sólida)

**MS/MS:** *Tandem Mass Spectrometry* (Espectrometria de massas sequencial)

**ONU:** *United Nations* (Organização das Nações Unidas)

**pK<sub>ow</sub>:** Coeficiente de partição octanol/água

**PSA:** Amina primária secundária

**QuEChERS:** acrônimo de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (Rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro)

**r:** Coeficiente de correlação linear

**RSD:** *Relative Standard Deviation* (Estimativa do desvio padrão relativo)

**s:** Estimativa do desvio padrão absoluto

**SPE:** *Solid Phase Extraction* (Extração em fase sólida)

**SRM:** *Selected Reaction Monitoring* (Monitoramento de Reações Seleccionadas)

**UFLC:** *Ultra Fast Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida Ultrarrápida)

**t<sub>R</sub>:** Tempo de retenção

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
<b>1.1. PEIXES</b> .....	20
<b>1.1.1. TILÁPIA</b> .....	21
<b>1.1.2. INFECÇÕES EM PEIXES</b> .....	22
<b>1.1.3. ANTIBIÓTICOS VETERINÁRIOS</b> .....	23
<b>1.2. BIOCONCENTRAÇÃO</b> .....	25
<b>1.3. FLORFENICOL</b> .....	25
<b>1.3.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS</b> .....	26
<b>1.4. ALIMENTOS SEGUROS</b> .....	26
<b>1.4.1. AGÊNCIAS REGULADORAS</b> .....	27
<b>1.4.2. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS</b> .....	28
<b>1.4.2.1. Ingestão diária aceitável</b> .....	28
<b>1.4.2.2. Limite máximo de resíduos</b> .....	28
<b>1.4.2.3. Período de carência</b> .....	29
<b>1.5. PREPARO DE AMOSTRA PARA EXTRAÇÃO DE FLORFENICOL E FLORFENICOL AMINA EM MÚSCULO DE PEIXES</b> .....	29
<b>1.5.1. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO</b> .....	29
<b>1.5.1.1. Extração sólido-líquido</b> .....	30
<b>1.5.1.2. Extração em fase sólida</b> .....	30
<b>1.5.1.3. Dispersão de matriz em fase sólida</b> .....	31
<b>1.5.1.4. QuEChERS</b> .....	31
<b>1.5.1.5. Microextração líquido-líquido dispersiva</b> .....	32
<b>1.6. TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO</b> .....	35
<b>1.6.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA</b> .....	35
<b>1.6.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS</b> .....	36

1.6.2.1.	Fonte de ionização por eletronebulização .....	36
1.6.2.2.	Íon trap .....	37
1.6.2.3.	Quadrupolo .....	38
1.6.2.4.	Efeito matriz no espectrômetro de massas .....	38
1.6.3.	VALIDAÇÃO .....	39
1.6.3.1.	Estabilidade dos padrões em solução e na matriz biológica .....	39
1.6.3.2.	Seletividade .....	40
1.6.3.3.	Efeito matriz.....	40
1.6.3.4.	Faixa linear e linearidade.....	40
1.6.3.5.	Precisão e exatidão .....	40
1.6.3.6.	Limite de detecção e de quantificação .....	40
1.6.3.7.	Limite de decisão .....	40
1.6.3.8.	Capacidade de detecção.....	41
<b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS.....</b>		<b>42</b>
2.	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
2.1.	<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>43</b>
2.2.	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>		<b>44</b>
3.	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>45</b>
3.1.1.	<b>MATERIAIS .....</b>	<b>45</b>
3.1.1.1.	<b>EQUIPAMENTOS .....</b>	<b>45</b>
3.1.2.	<b>MATERIAIS E REAGENTES .....</b>	<b>46</b>
3.1.3.	<b>PADRÕES.....</b>	<b>46</b>
3.1.4.	<b>COLUNAS CROMATOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>
3.1.5.	<b>SOLVENTES.....</b>	<b>47</b>
3.2.	<b>MÉTODO ANALÍTICO.....</b>	<b>47</b>

<b>3.2.1. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS</b> .....	47
<b>3.2.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA</b> .....	47
3.2.2.1. Colunas.....	47
3.2.2.2. Fase móvel .....	49
3.2.2.3. Volume de injeção .....	50
<b>3.2.3. PREPARO DA AMOSTRA - MÚSCULO DE TILÁPIA</b> .....	50
3.2.3.1. DLLME.....	50
3.2.3.2. Sub-Zero .....	54
3.2.3.3. QuEChERS .....	55
3.2.3.4. QuEChERS modificado .....	57
<b>3.2.4. PREPARO DA AMOSTRA - ÁGUA DE EXPOSIÇÃO DA TILÁPIA</b> .....	58
<b>3.3. VALIDAÇÃO</b> .....	59
<b>3.3.1. ESTABILIDADE DOS PADRÕES</b> .....	59
3.3.1.1. Solução .....	59
3.3.1.2. Matriz biológica .....	59
<b>3.3.2. SELETIVIDADE</b> .....	60
<b>3.3.3. EFEITO MATRIZ</b> .....	60
<b>3.3.4. FAIXA LINEAR E LINEARIDADE</b> .....	61
<b>3.3.5. PRECISÃO</b> .....	62
<b>3.3.6. EXATIDÃO</b> .....	62
<b>3.3.7. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO E DE DETECÇÃO</b> .....	63
<b>3.3.8. LIMITE DE DECISÃO E CAPACIDADE DE DETECÇÃO</b> .....	63
<b>3.4. ENSAIOS DE BIOCONCENTRAÇÃO</b> .....	64
3.4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	64
3.4.2. MÉTODO .....	64
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	67

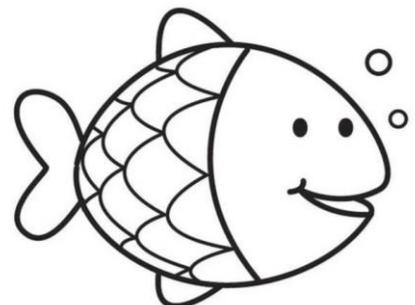
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>68</b>
<b>4.1.</b>	<b>OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS</b>	<b>68</b>
<b>4.1.1.</b>	<b>ESPECTRÔMETRO DE MASSAS SEQUENCIAL</b>	<b>68</b>
<b>4.1.2.</b>	<b>CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA</b>	<b>69</b>
<b>4.1.2.1.</b>	<b>Colunas</b>	<b>69</b>
<b>4.1.2.2.</b>	<b>Fase móvel e volume de injeção</b>	<b>70</b>
<b>4.2.</b>	<b>PREPARO DA AMOSTRA</b>	<b>73</b>
<b>4.3.</b>	<b>VALIDAÇÃO DO MÉTODO</b>	<b>77</b>
<b>4.3.1.</b>	<b>ESTABILIDADE DOS PADRÕES</b>	<b>77</b>
<b>4.3.2.</b>	<b>EFEITO MATRIZ</b>	<b>77</b>
<b>4.3.3.</b>	<b>SELETIVIDADE</b>	<b>78</b>
<b>4.3.4.</b>	<b>FAIXA LINEAR E LINEARIDADE</b>	<b>78</b>
<b>4.3.5.</b>	<b>EXATIDÃO E PRECISÃO</b>	<b>80</b>
<b>4.3.6.</b>	<b>LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO E DE DETECÇÃO</b>	<b>82</b>
<b>4.3.7.</b>	<b>LIMITE DE DECISÃO E CAPACIDADE DE DETECÇÃO</b>	<b>82</b>
<b>4.4.</b>	<b>ENSAIOS DE BIOCONCENTRAÇÃO</b>	<b>83</b>
<b>4.4.1.</b>	<b>ANIMAIS EXPERIMENTAIS</b>	<b>83</b>
<b>4.4.2.</b>	<b>CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS</b>	<b>83</b>
<b>4.4.3.</b>	<b>CÁLCULO DO FATOR DE BIOCONCENTRAÇÃO</b>	<b>83</b>
<b>4.4.4.</b>	<b>CÁLCULO DO PERÍODO DE DEPLEÇÃO</b>	<b>91</b>
	<b>CAPÍTULO V. CONCLUSÃO</b>	<b>93</b>
	<b>CAPÍTULO VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>95</b>
	<b>CAPÍTULO VII. ANEXO</b>	<b>107</b>

---

# CAPÍTULO I.

## INTRODUÇÃO

---



## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. PEIXES

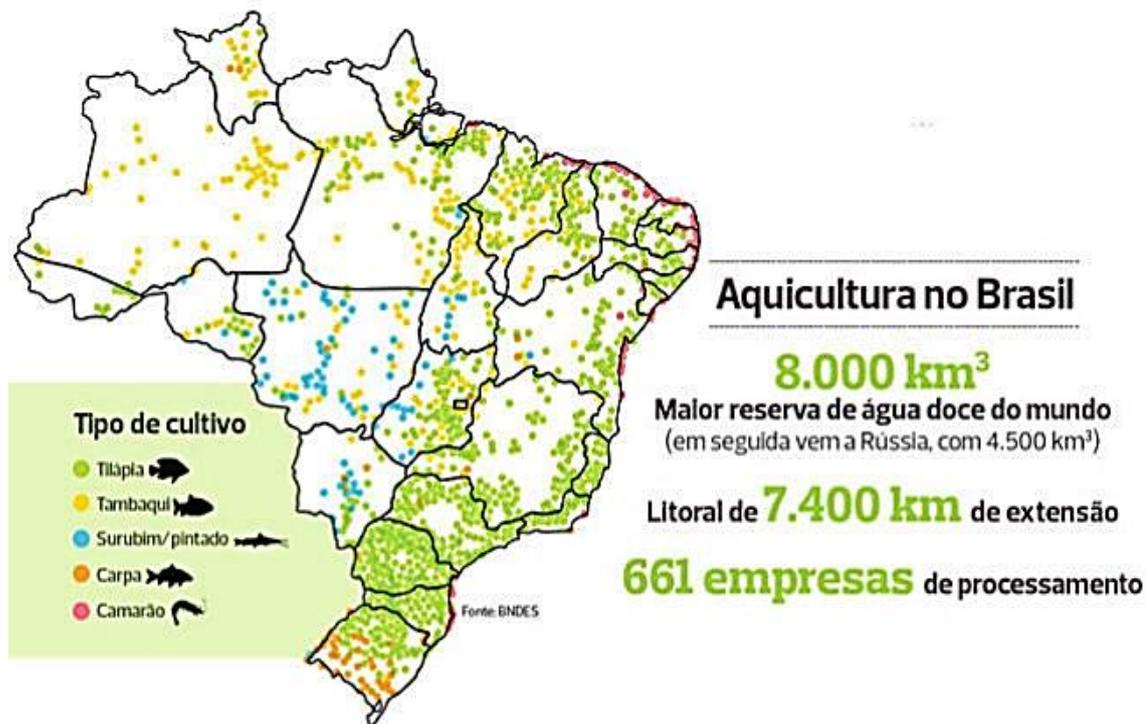
O avanço na medicina, ciência, tecnologia e educação teve como resultado o crescimento populacional. Segundo dados da Organização das Nações Unidas (ONU), até 2047 haverá um aumento da população brasileira para 232,8 milhões de pessoas. [1, 2] Devido a esse crescimento, se teve um aumento na demanda por alimentos e por fontes de proteínas, provenientes da criação de bovinos, suínos, da avicultura e da aquicultura.

A aquicultura, segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), é o cultivo de organismos aquáticos, como peixes, crustáceos, moluscos e plantas aquáticas em água doce e salgada sob condições controladas [3] e, segundo a lei nº 11.959, a aquicultura é a atividade de cultivo de organismos, cujo ciclo de vida em condições naturais se dá total ou parcialmente em meio aquático, implicando a propriedade do estoque sob cultivo, equiparada à atividade agropecuária. [4]

Atualmente, a aquicultura é o sistema de produção agropecuário que mais cresce no mundo e apresenta grande potencial de expansão devido à busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis. [5] O pescado é uma das principais fontes de proteína na alimentação humana, proporcionando uma dieta saudável, com alto valor proteico, rica em vitaminas A, B<sub>12</sub>, C e D e ácidos graxos poliinsaturados de boa qualidade, como o ômega-3. [6]

A produção mundial de pescado tem crescido a uma taxa média anual de 3,2% nos últimos 50 anos. [7] Em 2016, a produção mundial de pescado foi de aproximadamente 170,9 milhões de toneladas, sendo o Brasil o 13º lugar no ranking. [8] O país tende a registrar crescimento de 104% na pesca e na aquicultura até 2025, [9] visto que possui grande área territorial, com uma costa litorânea de 7,4 mil quilômetros, 8 mil quilômetros cúbicos de reservatórios de águas doces, clima favorável, mão de obra abundante e crescente mercado interno. O consumo de peixes no Brasil é de 14,4 kg por habitante por ano, valor maior do que o recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), de 12 kg por habitante por ano.

Cada região brasileira se especializa em determinado tipo de pescado. A Figura 1 mostra a distribuição da produção de pescados no Brasil.



**Figura 1.** Produção de peixes no Brasil com o tipo de cultivo em cada região do país. [7]

Na região Centro-Oeste, predomina a produção de tambaqui e pintado. No Norte, de tambaqui. No Nordeste e no Sul, da tilápia e do camarão. No Sudeste, da tilápia.

### 1.1.1. TILÁPIA

A espécie de peixe mais produzida no Brasil é a tilápia (*Oreochromis niloticus*), com 51,7 % da produção, devido às ótimas condições para a exploração no país, sendo de grande interesse econômico. [10]

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Figura 2) é um peixe de água doce distribuído em todas as bacias do Brasil, habitando em lagoas e represas. Pertence à família ciclídeos e subfamília *Pseudocrenilabrinae*. [11] É um peixe de escamas, que pode atingir 45 cm de comprimento e até 2,5 kg de peso. As tilápias se alimentam de plantas, algas e restos de organismos. [12] A faixa ideal de temperatura para sua criação é de 29 a 31 °C e o pH entre 6,0 e 8,0. [13]

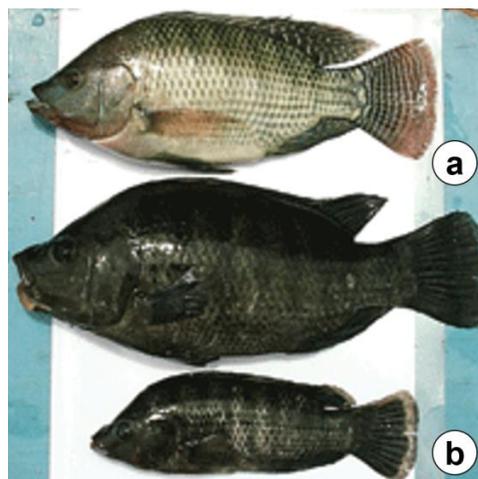


**Figura 2.** Tilápia (*Oreochromis niloticus*).

A tilápia é nativa da África e apresenta várias características, como boa qualidade da carne, alto teor de proteínas, baixo custo e fácil reprodução, tanto nos sistemas de cultivo extensivo quanto intensivo, pertencendo ao grupo de peixes que mais cresce em cativeiro. No país, há grande demanda tanto para o mercado interno quanto para o externo, sendo o Ceará o principal estado consumidor da espécie no país e, os principais destinos de exportação, a Espanha e os Estados Unidos. [12]

### **1.1.2. INFECÇÕES EM PEIXES**

Para suprir a grande demanda na produção de peixes, iniciou-se o processo do cultivo intensivo. Porém, esse cultivo pode induzir a uma maior ocorrência de infecções, pois a alta densidade populacional de peixes gera maior estresse, reduz a qualidade da água, ao alterar os valores de pH e oxigênio, conduz à nutrição inadequada dos peixes e aumenta o acúmulo de resíduos orgânicos. A propagação de bactérias como *Aeromonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Yersinia*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Shigella*, *Salmonella* e *Escherichia* [14] pode levar a infecções e ocasionar lesões superficiais, nas barbatanas, caudas e doenças branquiais em peixes. A Figura 3 ilustra a diferença entre peixes saudáveis e doentes:



**Figura 3. (a) Peixe sadio e (b) Peixes com infecção.**

### 1.1.3. ANTIBIÓTICOS VETERINÁRIOS

Controlar infecções é importante para que não haja redução na produção e para que o consumidor receba um alimento seguro e livre de microrganismos patogênicos. Para esse controle, utilizam-se os antibióticos, que são compostos usados na medicina humana, veterinária e na aquicultura para prevenir ou tratar infecções microbianas. Porém, o uso indiscriminado desses antibióticos no tratamento de doenças gera um aumento desses compostos no meio ambiente. [15]

Na aquicultura, os antibióticos podem ser liberados diretamente nas águas superficiais ou através da alimentação. Quando são liberados pela água pode ocorrer o processo de bioconcentração do composto no tecido do animal e, quando o processo se dá pela adição do antibiótico na ração, é denominado bioacumulação. A bioconcentração e a bioacumulação ocorrem porque muitos destes compostos não são completamente metabolizados pelo organismo do animal, se acumulando nos tecidos mais compatíveis, de acordo com as características físico-químicas dessas substâncias. Quando esses fármacos se acumulam nos tecidos de peixes utilizados para alimentação, podem gerar problemas para o consumo humano.

Os resíduos e seus metabólitos também podem ser eliminados através da urina e das fezes desses organismos. Dependendo das características físico-químicas desses compostos, podem ser lixiviados, se acumular no solo ou nos corpos hídricos. Em contato com esses meios, pode favorecer o surgimento dos microrganismos resistentes e, também, gerar problemas toxicológicos aos organismos presentes nesses habitats. [16]

## 1.2. BIOCONCENTRAÇÃO

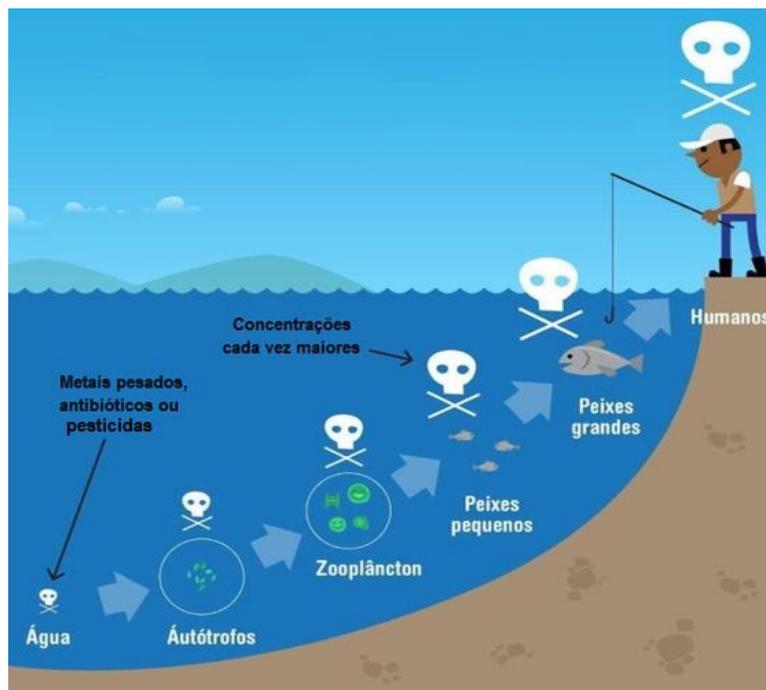
A bioconcentração ocorre quando a velocidade de absorção de um composto excede a velocidade de eliminação do mesmo, resultando em acúmulo no organismo do animal. Ela é estimada pelo fator de bioconcentração (*FBC*), que é calculado de acordo com a *Equação 1*, sendo a relação entre a concentração da substância no tecido do peixe ( $C_f$ ) e a concentração na água ( $C_w$ ), quando for atingido o equilíbrio aparente durante a fase de acúmulo do composto. [17]

$$FBC = \frac{C_f}{C_w} \quad (\text{Equação 1})$$

A bioconcentração (Figura 4) é a forma mais direta de avaliar o acúmulo de substâncias em organismos aquáticos. É um fenômeno importante para observar a manifestação de efeitos subletais do composto em organismos não alvo, para prevenir a contaminação de peixes utilizados como alimentos para o consumo humano e para proteger o ambiente aquático. [17]

Ensaio de bioconcentração podem ser realizados quando uma determinada concentração de um agente tóxico (antibióticos, pesticidas, metais pesados) é adicionada na água em que os peixes são criados. Esses estudos já foram realizados para avaliar o acúmulo de pesticidas, como dibenzodioxinas policloradas, em peixes e outras espécies aquáticas como crustáceos [18], inseticidas como endossulfan [17], cipermetrina, clorpirifós [19] e metais pesados como mercúrio [20]. Com relação aos fármacos, já foram realizados para avaliação do ibuprofeno em peixe boi de cabeça chata e bagre americano [21] e de sulfonamidas, fluoroquinolonas, macrolídeos e cloranfenicol em água, sedimento, produtos marinhos e utilizados na alimentação como camarão, ostras e caranguejo [22].

Avaliar a bioconcentração é relevante para confrontar os dados de acúmulo de um composto em determinado organismo com os valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), para calcular parâmetros cinéticos e compará-los com outros compostos e outras espécies. Por meio desse ensaio, pode-se também estudar a redução do composto dos tecidos do organismo quando cessa a exposição e calcular o tempo de depleção de resíduos dos peixes. [17] Com essas informações, podem-se estabelecer recomendações técnicas aos produtores a fim de obter um produto seguro para consumo e potencialmente comerciável.



**Figura 4.** Processos de bioconcentração e de bioacumulação de compostos no meio aquático.

Porém, na literatura não foram encontrados ainda estudos de bioconcentração de antibióticos veterinários em tilápias. Tendo em vista a grande administração de fármacos na produção e, também, durante o transporte de peixes, tornou necessário avaliar o potencial de acúmulo desses compostos. Dentre os antibióticos mais utilizados para fins veterinários tem se destacado o florfenicol.

### 1.3. FLORFENICOL

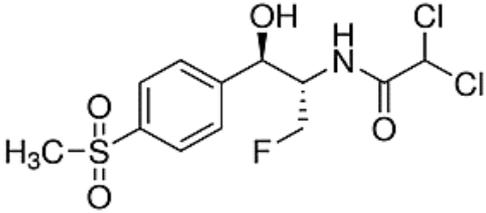
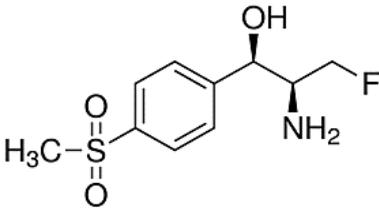
O florfenicol (FF) tem sido muito utilizado por ser um dos únicos antimicrobianos permitido pela legislação vigente no Brasil. [23] É um antibiótico com amplo espectro, eficaz contra muitas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O mecanismo de ação deste antibiótico é baseado na sua capacidade de inibir a síntese de proteína por meio da ligação à fração 50S do ribossomo bacteriano. [24]

O florfenicol pode ser utilizado para tratamento de infecções em peixes, porém, o uso indiscriminado desse antibiótico pode causar contaminação do ambiente e deixar resíduos nos alimentos, favorecendo a resistência das bactérias. Quando bactérias resistentes atingem o consumidor desses alimentos, podem causar infecções mais severas e diminuir a eficiência dos tratamentos. [25] Portanto, é de extrema importância avaliar o acúmulo de resíduos do florfenicol no músculo de tilápias, para minimizar riscos ao consumo e à saúde humana.

### 1.3.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

A Tabela 1 [26-28] apresenta as estruturas químicas e características físico-químicas do florfenicol e seu metabólito principal florfenicol amina (FFA):

**Tabela 1.** Estruturas químicas e propriedades físico-químicas do florfenicol e do florfenicol amina.

Estruturas químicas	Propriedades
<p style="text-align: center;">FLORFENICOL</p> 	<p>Fórmula: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>FNO<sub>4</sub>S            Massa molar: 358,220 g mol<sup>-1</sup>            Ponto de fusão: 153-154 °C            Densidade: 1,451 g/cm<sup>3</sup> (20 °C)  <b>pK<sub>a</sub>: 9,03</b>  <b>Coefficiente de partição (log K<sub>ow</sub>): 0,37</b>            Solubilidade: etanol, metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF)            Em água: 1,32 g L<sup>-1</sup> em pH 7,00</p>
<p style="text-align: center;">FLORFENICOL AMINA</p> 	<p>Fórmula: C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>FNO<sub>3</sub>S            Massa molar: 247,284 g mol<sup>-1</sup>            Ponto de fusão: 154°C            Densidade: 1,310 g/cm<sup>3</sup> (20 °C)  <b>pK<sub>a</sub>: 7,38</b>  <b>Coefficiente de partição (log K<sub>ow</sub>): -1,18</b>            Solubilidade: etanol, metanol, DMSO, DMF            Em água: Não disponível</p>

### 1.4. ALIMENTOS SEGUROS

O Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos de Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), tem como objetivo promover a segurança dos alimentos de origem animal produzidos no país. A principal base legal é a Instrução Normativa SDA nº 42, de 20 de dezembro de 1999. [29] Essa norma busca fiscalizar e conhecer o potencial de exposição da população aos resíduos nocivos e, também, de impedir o abate de animais com resíduos acima do Limite Máximo de Resíduo (LMR).

Para os compostos que geram riscos à saúde humana, é estabelecido um tempo mínimo para o esgotamento do composto do músculo do animal medicado, para atender ao LMR e obter um alimento seguro ao consumo humano. Esse tempo é denominado período de carência. [2]

No Brasil, segundo a instrução normativa nº 24 [30] o LMR do florfenicol em peixes é de 1000 µg kg<sup>-1</sup>.

Autores estudaram a presença de florfenicol em amostras de peixes, para verificar a concordância das concentrações encontradas com o LMR. Pan *et al.* [31] relataram que o FF não foi detectada em 25 amostras de corvina amarela, obtidas na China. Orlando *et al.* [32] relataram que uma das 15 amostras de tilápia, obtidas no Brasil, apresentou resíduo de FF em concentração de  $30 \text{ ng g}^{-1}$ , muito abaixo do LMR estabelecido pela legislação brasileira. O resíduo de FFA não foi encontrado nas amostras avaliadas. Rezk *et al.* [33] também relataram que o resíduo de FF foi detectado em concentração de  $(71 \pm 2) \text{ ng g}^{-1}$  em amostras de tilápias obtidas no Egito. Os resíduos encontrados em todos esses estudos estavam em concentração abaixo do LMR. Estes resultados confirmaram a segurança dessas amostras para consumo humano e que os antimicrobianos foram aplicados corretamente nas regiões amostradas.

#### 1.4.1. AGÊNCIAS REGULADORAS

Para monitorar os resíduos de fármacos em alimentos são utilizados métodos analíticos, para verificar a concordância dos resultados e confrontar com os dados da legislação vigente.

Há órgãos internacionais e nacionais responsáveis por elaborar guias de validação e normas, que têm como objetivo a proteção da saúde humana aos riscos associados à presença de contaminantes alimentares.

Os órgãos internacionais mais conhecidos são o *Codex Alimentarius*, Organização Mundial de Saúde (WHO, *World Health Organization*), a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e a Comunidade Europeia. [34]

A legislação em segurança alimentar não é uniforme em todo o mundo, com algumas diferenças, pois cada país tem um clima, uma cultura, disponibilidade e consumo de alimentos distintos, podendo variar o guia a ser utilizado em cada país e seus respectivos LMR.

A Comunidade Europeia elaborou a legislação para resíduos de fármacos em alimentos, por ser uma das maiores importadoras de alimentos do mundo. [34] No Brasil, o MAPA elaborou o Manual de Garantia da Qualidade Analítica, sendo o responsável pelo controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem animal. [35]

## 1.4.2. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

### 1.4.2.1. Ingestão diária aceitável

A ingestão diária aceitável (IDA) é a quantidade de uma substância, expressa em  $\mu\text{g kg}^{-1}$  massa corpórea, que pode ser ingerida diariamente, mesmo por toda a vida sem qualquer dano à saúde humana, à luz dos conhecimentos atuais.

O NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) é a maior dose de uma substância química que não produz efeitos adversos, sendo calculada na mais sensível de três espécies animais, sendo uma delas um não roedor.

A IDA pode ser obtida pela divisão do valor de NOAEL por um fator de segurança, que varia de 20 a 200, referente a uma margem de segurança, devido à extrapolação dos dados experimentais de toxicidade animal para humanos e para justificar possíveis diferenças de sensibilidade entre humanos. [36]

### 1.4.2.2. Limite máximo de resíduos

O LMR é definido como concentração máxima (expressa em  $\mu\text{g kg}^{-1}$  ou  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de um composto permitido legalmente ou que é admissível em um alimento. É baseado no tipo e quantidade de resíduo que não induz efeito adverso à saúde humana, considerando-se a IDA do composto.

Para estabelecer o LMR devem ser considerados os resíduos dos fármacos veterinários original e seus metabólitos, o processo de depleção das substâncias na espécie animal, o metabolismo em animais de laboratório e na espécie alvo, as condições de uso, dosagem do medicamento veterinário, farmacocinética, biodisponibilidade dos resíduos ligados, identificação de órgão e resíduo marcador, estimativa da exposição resultante do LMR recomendado, extensão do LMR para outros tecidos, ovos e leite de outras espécies. Considera-se também a quantidade de alimentos consumidos por uma população, porém pode levar a erros (superestimação ou subestimação do consumo), por considerar que todos os alimentos são consumidos da mesma forma, não levando em consideração que os alimentos podem ser consumidos em maior ou menor quantidade por uma população devido a questões climáticas, étnicas, culturais. [36]

### 1.4.2.3. Período de carência

O período de carência é o intervalo de tempo entre a última administração do medicamento veterinário e o abate do animal. Esse período tem como objetivo garantir que os peixes estejam com concentração de fármaco abaixo do LMR. Para a determinação do período de carência são realizados testes estatísticos, considerando-se as fases de absorção e eliminação do fármaco e a concentração de resíduos no animal nessas fases.

## 1.5. PREPARO DE AMOSTRA PARA EXTRAÇÃO DE FLORFENICOL E FLORFENICOL AMINA EM MÚSCULO DE PEIXES

Como os analitos se encontram em concentrações muito baixas ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  a  $\text{ng kg}^{-1}$ ) e a matriz de peixe é complexa, é necessário realizar uma etapa prévia de preparo de amostra, para concentrar e transferir o FF e o FFA, remover interferentes, evitando a coeluição com os compostos de interesse e garantindo a vida útil das colunas analíticas, para posteriormente serem analisados por uma técnica cromatográfica. [37]

O preparo da amostra é uma etapa crucial para um bom desempenho analítico, sendo a mais demorada do processo analítico (cerca de 80% do tempo total da análise) e pode introduzir erros, devido à perda do analito ou à contaminação da amostra. [37]

A escolha adequada da técnica de extração é essencial para obter resultados confiáveis e exatos e depende da matriz, da natureza da amostra, do analito, do estado físico, tamanho, pH, quantidade de gordura, pigmentos e proteínas, propriedades físico-químicas do analito, como massa molar, carga, polaridade, volatilidade e  $\text{pK}_a$ . O ideal é que o preparo de amostra seja o mais simples possível ou que não se tenha preparo de amostra, para reduzir o tempo de análise e os erros. [37]

### 1.5.1. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

As técnicas mais utilizadas para a extração de florfenicol e florfenicol amina em peixes são a extração sólido-líquido [33, 38-40], extração em fase sólida [32], dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) [31, 41] e QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). [42-44]

Porém, os métodos convencionais utilizam grande quantidade de solventes e/ou reagentes e, em geral, demandam muito tempo de análise. Atualmente, têm sido desenvolvidas técnicas miniaturizadas de extração, com consumo mínimo de reagentes e baixa geração de resíduos, como por exemplo a MicroExtração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês, *Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction*) [45] e o QuEChERS modificado.

#### 1.5.1.1. Extração sólido-líquido

A extração sólido-líquido (SLE, do inglês, *Solid Liquid Extraction*) é uma técnica empregada no preparo de amostras sólidas, solúveis em determinados solventes, e consiste numa partição do analito entre duas fases imiscíveis, nas quais apresenta diferentes solubilidades: composto mais hidrofílico se desloca para a fase aquosa e o mais hidrofóbico para a fase orgânica. [46]

A extração consiste em adicionar um solvente orgânico à amostra, seguida de agitação. Após a separação das fases, recolhe-se o solvente contendo o analito e o processo é repetido por mais vezes, a fim de aumentar a eficiência de extração. [46]

As vantagens da SLE são a simplicidade do método, baixo custo e possibilidade de utilizar vários tipos de solventes. Porém, possui desvantagens como ser um processo longo, possibilidade de ter perda do analito durante a extração, formação de emulsões, uso de grandes volumes de amostras e de solventes tóxicos e dificuldade na automação. [47]

#### 1.5.1.2. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE, do inglês, *Solid Phase Extraction*) foi introduzida em 1976 para suprir as desvantagens da extração líquido-líquido, ao consumir menos solvente orgânico, não formar emulsões, facilitar a automação, fornecer alta recuperação do analito e ser mais seletiva que a SLE.

Na SPE, a extração ocorre em quatro etapas: 1) condicionamento do sorvente com solvente adequado; 2) introdução da amostra, para a retenção do analito no sorvente e, às vezes, alguns interferentes ficam retidos; 3) limpeza (*clean-up*) com um solvente que remova somente os interferentes, porém não os analitos; 4) eluição do analito com um volume pequeno de eluente, um solvente seletivo para o analito e, posterior, análise cromatográfica.

A SPE também possui desvantagens, como o tempo longo de análise e o alto custo dos *manifolds* e cartuchos de extração, os quais são utilizados uma única vez e descartados. Esses cartuchos são preenchidos com 50 a 500 mg de sorvente, que possui tamanho de partícula de 40 a 60  $\mu\text{m}$ , fixado no tubo por meio de dois filtros. [48]

#### 1.5.1.3. Dispersão de matriz em fase sólida

A dispersão de matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*) foi introduzida em 1989 por Barker *et al* [49] e consiste em uma extração em que a amostra é diretamente combinada com um sorvente, permitindo que o analito seja disperso por todo o material extrator.

A extração consiste em três etapas principais: 1) introdução da amostra e do sorvente em um recipiente, para a trituração e homogeneização. O sorvente atua como um abrasivo, rompendo a estrutura da amostra e permitindo adsorver os compostos da matriz, formando um único material com a fase sólida da coluna; 2) transferência da mistura da amostra com o sorvente para uma coluna; 3) eluição com solvente apropriado. [50]

Em relação à SPE, a MSPD tem as vantagens de ter uma maior área de contato para a extração e poder ser usada para matrizes sólidas e semi-sólidas. [50]

#### 1.5.1.4. QuEChERS

Em 2003, Anastassiades *et al.* [51] introduziram o método para extração de resíduos de pesticidas denominado QuEChERS, que é o acrônimo de **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe**, em inglês, e tem como significado um método rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro.

Esse método é baseado em três etapas principais: 1) extração com acetonitrila, que possibilita a precipitação de proteínas e que uma menor quantidade de lipídeos provenientes da amostra seja extraída, sendo também um solvente que tem ampla capacidade de extração de compostos com variadas polaridades; 2) adição de sais (sulfato de magnésio e cloreto de sódio), que promove o efeito *salting out*, diminuindo a solubilidade dos analitos na fase aquosa e a quantidade de água na fase orgânica, promovendo a extração dos compostos para a acetonitrila; após a

agitação e centrifugação, o sobrenadante é removido e transferido para outro tubo de centrífuga, para a etapa seguinte; 3) *clean-up*, também chamada extração em fase sólida dispersiva (d-SPE), que tem o objetivo de remover a água residual e possíveis interferentes ainda presentes no sobrenadante. Em geral se utiliza o sorvente amina primária secundária (PSA, do inglês, *Primary Secondary Amine*), que remove as interferências da matriz, já que sua estrutura bidentada tem alto efeito quelante, retendo os compostos polares presentes na matriz.

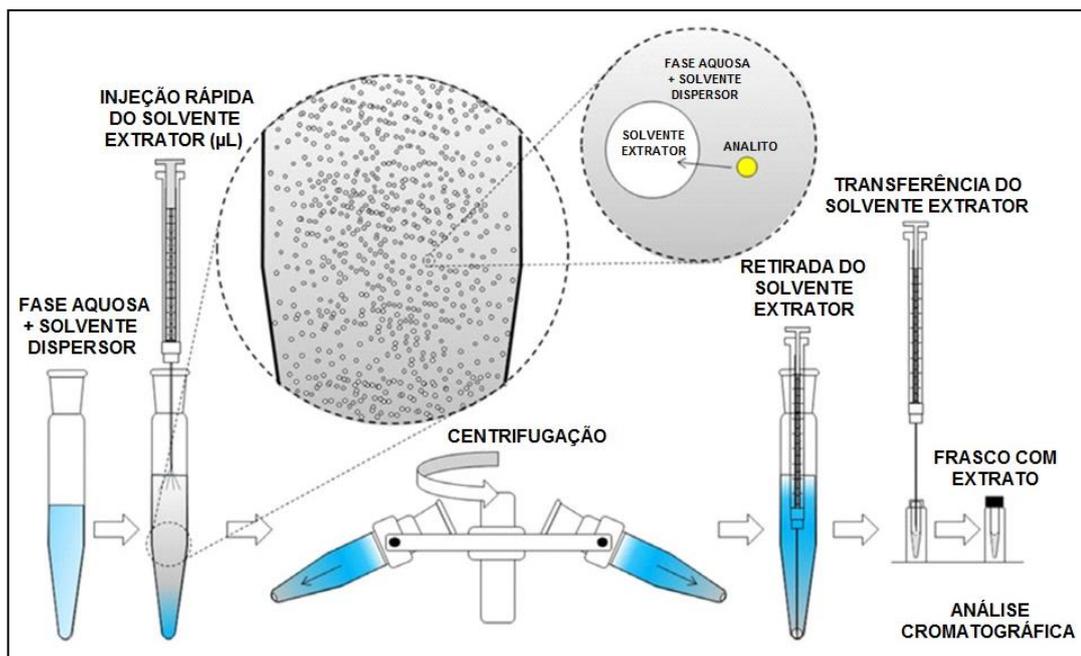
Há três métodos QuEChERS oficiais: o QuEChERS original [51], QuEChERS acetato [52] e QuEChERS citrato [53]. No “QuEChERS acetato” é adicionado acetato de sódio para tamponamento do meio em pH 4,8, para melhorar a recuperação. O “QuEChERS citrato” utiliza uma mistura de citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato sesquiidratado para tamponamento do meio em pH 5,0-5,5. Há muitas modificações do QuEChERS, com variações de usos de sorventes no *clean up*, como o uso de C<sub>18</sub>, carbono grafitizado e outros sorventes. Atualmente, há várias vertentes do uso do QuEChERS, para análise de pesticidas, fármacos, poluentes, nas mais diversas amostras, visto a versatilidade desse método. [54]

#### **1.5.1.5. Microextração líquido-líquido dispersiva**

A microextração líquido-líquido dispersiva (Figura 5) foi proposta em 2006 por Rezaee *et al.* [45] e consiste em uma extração baseada em um sistema ternário de solventes: dispersor, extrator (fase orgânica) e fase aquosa. O solvente extrator e a fase aquosa devem ser imiscíveis entre si e a extração ocorre pelo processo de partição dos analitos entre essas duas fases líquidas imiscíveis, sendo governada pela polaridade. O solvente dispersor deve ser solúvel tanto na amostra aquosa quanto na fase orgânica, para favorecer a formação da dispersão.

A extração consiste na injeção rápida de um jato do solvente extrator em uma mistura de solvente dispersor e da amostra aquosa contendo os analitos, formando uma dispersão de microgotas do solvente orgânico na fase aquosa.

Devido à grande área superficial entre o solvente extrator e a amostra aquosa, a extração dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica é rápida, pois favorece o processo de partição e, conseqüentemente, a extração. Após a extração, a dispersão é centrifugada e a fase orgânica é transferida para a injeção no sistema cromatográfico para a quantificação dos analitos. [55]



**Figura 5.** Esquema das etapas envolvidas na extração por DLLME. Adaptada de [55] com permissão.

A Tabela 2 resume as principais técnicas de preparo de amostra encontradas na literatura utilizadas para a extração de florfenicol e florfenicol amina em peixes.

**Tabela 2.** Técnicas de extração de florfenicol e florfenicol amina em peixes.

Espécie	Tecido	Extração	Coluna	LD	LQ	Faixa linear	Recuperação	Equipamento	Referência
Tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Músculo	Extração sólido líquido com acetato de etila e hexano no <i>clean up</i>	Acquity UPLC BEH C <sub>18</sub>	FF: 0,006 µg g <sup>-1</sup> FFA: 0,001 µg g <sup>-1</sup>	FF: 0,0025 µg g <sup>-1</sup> FFA: 0,003 µg g <sup>-1</sup>	FF e FFA: 0,125-1,25 µg g <sup>-1</sup>	FF: 74,6-79,9% FFA: 38,1-52,4%	UPLC-MS/MS	[32]
Peixe	Músculo	Extração sólido líquido com acetato de etila:hidróxido de amônio (98:2, v/v) e remoção de lipídeos com hexano	XTerra C <sub>18</sub>	CC <sub>α</sub> FF: 0,003 µg g <sup>-1</sup> CC <sub>α</sub> FFA: 0,25 µg g <sup>-1</sup>	CC <sub>β</sub> FF: 0,003 µg g <sup>-1</sup> CC <sub>β</sub> FFA: 0,28 µg g <sup>-1</sup>	FF: 0,002-0,003 µg g <sup>-1</sup> FFA: 0,10-0,30 µg g <sup>-1</sup>	FF: 84,0-108,0% FFA: 93,0-98,0%	LC-MS/MS	[39]
<i>Large yellow croaker</i> ( <i>Pseudosciaena crocea</i> )	Músculo	Dispersão da matriz em fase sólida com sílica derivatizada com C <sub>18</sub> e eluição com acetonitrila:água 50:50 (v/v)	Acquity BEH C <sub>18</sub>	CC <sub>α</sub> FF: 0,00002 µg g <sup>-1</sup>	CC <sub>β</sub> FF: 0,0001 µg g <sup>-1</sup>	FF: 0,0005-0,02 µg kg <sup>-1</sup>	FF: 85,9-98,7%	UPLC-MS/MS	[31]
Tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Tecidos	Extração sólido líquido com acetonitrila e metanol	Agilent Poroshell 120 EC, C <sub>18</sub>	-	FF: 0,001 µg g <sup>-1</sup>	FF: 0,003-0,045 µg g <sup>-1</sup>	FF: 96,91-104,33%	LC-MS/MS	[33]
Peixe	Músculo	Dispersão da matriz em fase sólida com C <sub>18</sub> e eluição com acetato de etila/acetonitrila	Hypersil ODS C <sub>18</sub>	CC <sub>α</sub> FF: 0,00002 µg g <sup>-1</sup> CC <sub>α</sub> FFA: 0,00004 µg g <sup>-1</sup>	CC <sub>β</sub> FF: 0,00007 µg g <sup>-1</sup> CC <sub>β</sub> FFA: 0,00018 µg g <sup>-1</sup>	FF: 0,00005-0,0008 µg g <sup>-1</sup> FFA: 0,0001-0,0016 µg g <sup>-1</sup>	FF: 85,8-88,1% FFA: 85,6-92,5%	LC-MS/MS	[41]
Tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> e <i>O. aureus</i> )	Músculo e pele	Extracção sólido líquido com diclorometano e acetato de etila no <i>clean up</i>	C <sub>18</sub>	FFA: 0,04 µg g <sup>-1</sup>	FFA: 0,08 µg g <sup>-1</sup>	FFA: 0,5-2,0 µg g <sup>-1</sup>	FFA: 95%	HPLC-UV	[56]
Tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> e <i>O. aureus</i> )	Bile, brânquias, fígado, músculo e rins	Extração sólido líquido com acetato de etila e remoção de lipídeos com hexano	Nucleodur C <sub>18</sub>	-	FF: 0,03 µg g <sup>-1</sup>	FF: 0,03-16,0 µg mL <sup>-1</sup>	FF: 89,16-96,13%	HPLC-UV	[57]

## 1.6. TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO

Para a determinação, os equipamentos mais utilizados são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*) acoplada a detectores ultravioleta ou à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) e por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS, do inglês, *Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry*). Para a separação, a coluna mais utilizada é a C<sub>18</sub>, com fase móvel variando entre acetonitrila e metanol.

A técnica de LC-MS/MS combina vantagens como alta seletividade e eficiência de separação da cromatografia líquida, com a informação estrutural e razão massa carga ( $m/z$ ), da espectrometria de massas. Os compostos podem ser separados pela cromatografia líquida e detectados e quantificados pelo espectrômetro de massas.

### 1.6.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida teve seu início em 1950 [58] e tem sido utilizada até os dias de hoje. Consiste em uma técnica físico-química de separação em que os componentes da mistura são distribuídos entre uma fase móvel e uma estacionária. A amostra é injetada no injetor e a fase móvel é bombeada continuamente, fazendo com que os analitos migrem de acordo com as interações entre a fase móvel e a estacionária. No fim da coluna há um detector, em que o sinal é gerado em forma de cromatograma, no qual a área do pico é proporcional a concentração do analito. [59]

A cromatografia líquida foi desenvolvida entre os anos 60 e 70 [60] e, atualmente, emprega colunas de 5 a 30 cm de comprimento, 2 a 5 mm de diâmetro interno, recheadas com partículas porosas entre 2 a 5  $\mu\text{m}$  e utiliza uma bomba de alta pressão que suporta pressões de até 15000 psi. [58, 61]

O constante desenvolvimento da HPLC com o passar dos anos tem buscado por inovações tecnológicas, de forma a modificar a fase estacionária, como novas partículas para recheio, com formas regulares e diâmetros menores, a fim de torná-la mais seletiva, eficiente, quimicamente e fisicamente mais estável. [59]

### 1.6.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O espectrômetro de massas é um instrumento que permite determinar a massa molar de íons em fase gasosa. É formado pela fonte de ionização, analisador de massas e detector de íons.

Quando se utiliza um cromatógrafo a líquido acoplado a um espectrômetro de massas (LC-MS), é necessário utilizar uma interface, pois as vazões empregadas em HPLC são altas ( $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ) e não podem ser bombeadas diretamente no interior do espectrômetro, que opera a baixas pressões ( $1,3 \times 10^{-4} \text{ Pa}^2$ ). [62] Essa interface é uma fonte de ionização, que deve remover grande parte da fase móvel e realizar a ionização do analito. As fontes de ionização mais empregadas são a ionização por eletronebulização (ESI, do inglês, *ElectroSpray Ionization*), ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e a fotoionização à pressão atmosférica (APPI, do inglês, *Atmospheric Pressure PhotoIonization*). A fonte de ionização mais utilizada com cromatografia líquida é o ESI. [62]

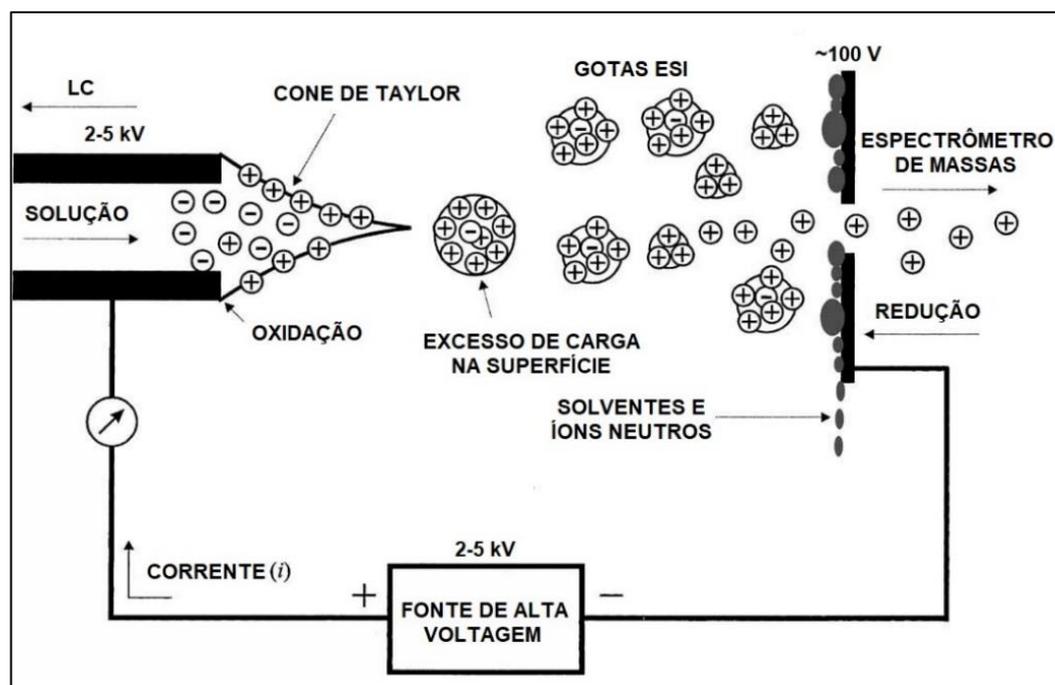
#### 1.6.2.1. Fonte de ionização por eletronebulização

A ionização por ESI foi desenvolvida em 1984 por Yamashita & Fenn [63] e consiste na passagem da fase móvel contendo o analito de interesse, proveniente do sistema cromatográfico, em um capilar à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem (500 a 4500 V).

Na saída do capilar é formado um *spray* e a ionização ocorre diretamente na solução. As gotas carregadas do *spray* são dessolvatadas, na presença de um gás de nebulização (nitrogênio) aquecido, para facilitar a volatilização. As gotas diminuem até que a força de repulsão entre íons de mesma carga seja maior que a tensão superficial. São produzidos então íons do analito a partir destas gotas, que são transferidos para o espectrômetro de massas. [62]

Em geral, são adicionados 0,1 a 0,2 % de ácido fórmico na fase móvel para facilitar a protonação de sítios básicos, formando ( $[M + H]^+$ ) quando a análise é feita em modo positivo ou 0,1 a 0,5 % de solução de hidróxido de amônio para a desprotonação de sítios ácidos, formando ( $[M - H]^-$ ) quando a análise é feita em modo negativo.

A Figura 6 apresenta um esquema de uma fonte de ESI.



**Figura 6.** Esquema de uma fonte de ionização por eletronebulização. Adaptado de [64] com permissão.

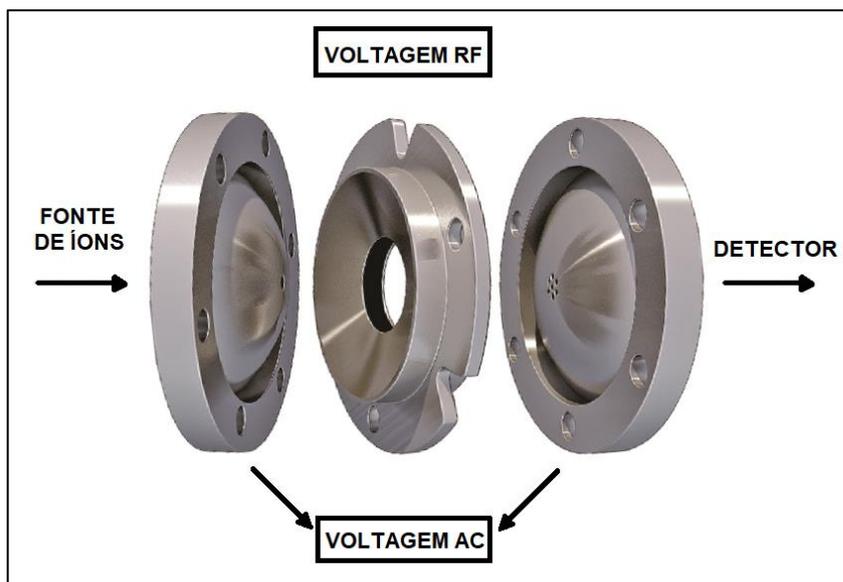
Após a molécula ser ionizada, é detectada em um analisador de massas.

#### 1.6.2.2. Ion trap

O ion-trap é um analisador de massas, sendo uma armadilha iônica desenvolvida por Wolfgang Paul [65] em 1989. Consiste em um eletrodo em forma de anel e duas tampas conectados à uma voltagem RF/AC, que forma um potencial oscilante de aprisionamento de íons no tempo. Após um tempo, aplica-se uma radiofrequência para tornar os íons instáveis e liberá-los no *trap*. [62]

O “*trap*” captura todos os íons que entram no espectrômetro de massas e os que não são de interesse são ejetados. Os remanescentes são dissociados e liberados para gerar o espectro de massas.

O analisador de massas *ion-trap* está mostrado na Figura 7.



**Figura 7.** Esquema de um analisador de massas *ion-trap*. Adaptado de [66] com permissão.

### 1.6.2.3. Quadrupolo

O quadrupolo é um analisador de massas muito utilizado devido à simplicidade, baixo custo, boa linearidade e facilidade de operação. É composto por quatro barras cilíndricas de metal, dispostas em dois pares, sendo um par com potencial elétrico positivo e um com potencial negativo. Quando se aplica uma corrente contínua (DC) e radiofrequência ( $R_f$ ), o par positivo atua como filtro para massas elevadas e o negativo, para as massas menores. Somente os íons com determinada razão massa/carga ( $m/z$ ), que estejam em ressonância com o campo aplicado, irão passar pelas barras do quadrupolo e serão detectados. Os demais terão trajetórias instáveis, sendo eliminados. [66]

### 1.6.2.4. Efeito matriz no espectrômetro de massas

Em análise quantitativa com ESI-MS há uma limitação, denominado efeito matriz, em que a matriz coextraída com os analitos pode alterar a resposta do sinal, causando supressão ou aumento, resultando em falta de precisão, linearidade, reprodutibilidade e recuperação.

O efeito matriz pode ser positivo, negativo ou nulo. Quando é positivo, a matriz gera um aumento no sinal analítico e ganho de sensibilidade. Quando é negativo, a matriz gera uma supressão iônica, ou seja, uma redução no sinal

analítico, com perda de detectabilidade. A supressão pode ocorrer quando há competição pela ionização entre componentes da matriz e o analito. Quando o efeito é nulo, há ausência de efeito matriz.

A cromatografia líquida auxilia na redução da supressão iônica, pois os analitos são separados e podem eluir em tempos diferentes dos interferentes. Mas, em geral, para amostras complexas, a etapa anterior de preparo da amostra remove os compostos da matriz que suprimem a ionização dos analitos, como proteínas, lipídeos, sais e ácidos graxos. Além disso, deve-se também realizar procedimentos de limpeza para melhorar a eficiência do sistema LC-MS/MS e a vida útil da coluna. [67]

### **1.6.3. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando que o método utilizado seja adequado para identificar ou quantificar, gerando confiabilidade dos resultados, controlando os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão dos dados. [68]

Os parâmetros de validação de métodos analíticos para controle de resíduos de fármacos veterinários em alimentos de origem animal, seguindo os guias de validação do MAPA e da Comunidade Europeia (CE), são seletividade, faixa linear, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), de quantificação (LQ), de decisão ( $CC_{\alpha}$ ) e capacidade de detecção ( $CC_{\beta}$ ). [34, 35]

#### **1.6.3.1. Estabilidade do padrão em solução e matriz biológica**

Para minimizar desvios no resultado da análise devido à insuficiente estabilidade da substância em solução e na matriz durante o armazenamento, devem ser realizados testes de estabilidade dos padrões. [34]

Em solução, a estabilidade é avaliada comparando a concentração dos analitos nas soluções padrão armazenadas, com as obtidas nas soluções recém-preparadas, para observar se houve degradação. Determina-se assim o período e as condições adequados em que as soluções devem ser armazenadas. [34]

Na matriz, a avaliação da estabilidade do analito é feita durante o período em que as amostras permaneceram congeladas. Devem ser matrizes fortificadas com a substância a analisar. [34]

### **1.6.3.2. Seletividade**

A seletividade é a habilidade do método em distinguir o analito na presença de interferentes e na presença de todos os componentes da amostra. [35]

### **1.6.3.3. Faixa linear e linearidade**

A faixa linear é a que corresponde à faixa da curva analítica que apresenta linearidade adequada. A linearidade é a capacidade de o método demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

### **1.6.3.4. Precisão e exatidão**

A precisão é a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra em condições definidas. Pode ser expressa por meio da repetibilidade (precisão intradia), precisão intermediária (precisão inter-dias) e reprodutibilidade (ensaio interlaboratorial). [35]

A exatidão é o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro, sendo um desvio do valor real determinado através da veracidade e da precisão. [69]

### **1.6.3.5. Limite de detecção e de quantificação**

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, sob condições experimentais estabelecidas. [30] O limite de quantificação é a menor concentração ou teor que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. [30]

### **1.6.3.6. Limite de decisão**

O limite de decisão ( $CC_{\alpha}$ ) é o limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro de  $\alpha$ . [34] O erro  $\alpha$  é a probabilidade de uma amostra analisada ser conforme apesar de se ter obtido um resultado não conforme (falsa decisão não conforme).

**1.6.3.7. Capacidade de detecção**

A capacidade de detecção ( $CC_{\beta}$ ) é o teor mais baixo de substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro de  $\beta$ . O erro  $\beta$  é a probabilidade de uma amostra analisada ser não conforme, apesar de se ter obtido um resultado conforme (falsa decisão conforme).

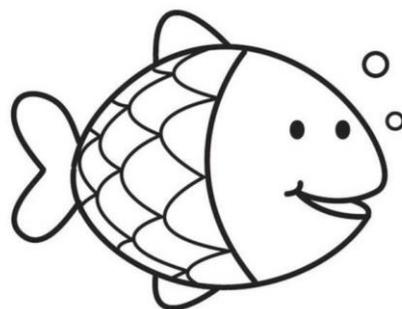
[34]

---

# CAPÍTULO II.

## OBJETIVOS

---



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Desenvolver e validar um método para determinação do florfenicol e seu metabólito florfenicol amina em músculo de tilápia, empregando a LC-MS/MS e aplicá-lo nas análises de amostras provenientes de ensaios *in vivo*, para avaliar a dinâmica do acúmulo deste antibiótico e seu metabólito nos peixes.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Otimizar o preparo da amostra empregando uma técnica de extração miniaturizada e comparar com QuEChERS;
- ✓ Desenvolver e validar um método de separação e quantificação do antibiótico florfenicol e seu metabólito florfenicol amina em músculo de tilápia empregando a LC-MS/MS, de forma que atenda os valores de LMR;
- ✓ Empregar o método desenvolvido em amostras de tilápias, provenientes de ensaios de bioconcentração para determinar o fator de bioconcentração e o período de depleção do florfenicol, para aplicação em protocolos de transporte de peixes.

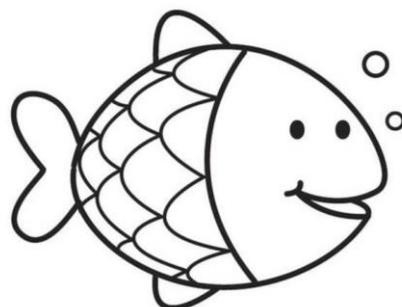
---

# CAPÍTULO III.

PARTE

EXPERIMENTAL

---



### 3. PARTE EXPERIMENTAL

Este projeto foi realizado em parceria com a Embrapa Meio Ambiente, com os pesquisadores Dra. Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz e o Dr. Claudio Martin Jonsson. A parte analítica foi realizada no Laboratório de Resíduos e Contaminantes e os ensaios com peixes no Laboratório de Ecossistemas Aquáticos.

A seguir, estão descritos os materiais, equipamentos e métodos empregados durante o projeto.

#### 3.1.1. MATERIAIS

##### 3.1.1.1. EQUIPAMENTOS

- ✓ Aquecedor Eletrônico *Atman*, 300 W;
- ✓ Aquecedor para aquário *Hopar H-606*, 200 W;
- ✓ Agitador MS1 *Minishaker IKA*;
- ✓ Agitador *MultiReax Heidolph*;
- ✓ Balança analítica Shimadzu AY220;
- ✓ Balança semi-analítica BG4400;
- ✓ Bomba de aeração *Big Air A320 superpump*;
- ✓ Bomba de vácuo *Dia-Pump Fanem*;
- ✓ Centrífuga *Multifuge 3L-R Heraeus*;
- ✓ Cromatógrafo a líquido (HPLC) UFLC Shimadzu LC20AT de bomba binária, Nexera SR system, amostrador automático, modelo SIL 20AC, acoplado ao analisador de massas *Ion trap (MS/MS - IonTrap) amaZon X*. Software utilizado para aquisição e tratamento de dados *QuantAnalysis 2.0*;
- ✓ Espectrofotômetro *Hach DR 2000*;
- ✓ Filtro externo de carvão ativo *Atman HF-0600*;
- ✓ Motobomba submersa *Scarlobetter SB1000C*;
- ✓ Processador *Robot Coupe Blixer 3 3,7*; Merse;
- ✓ Sonda multiparâmetro Horiba U53;
- ✓ Termômetro de vidro *Jad aquarium*;
- ✓ Ultrassom *Transsonict 660/H Elma DVE Geputte Sicherheit*.

### 3.1.2. MATERIAIS E REAGENTES

- ✓ Acetato de amônio *Emsure Merck*; Lote: A0189816;
- ✓ Acetato de sódio anidro P.A. *Synth*; Lote: 125787;
- ✓ Ácido acético 100% glacial ACS *Emsure*; Lote: K46328663;
- ✓ Ácido fórmico >95% *Sigma Aldrich*; Lote: SZBF0680V F0507-1L;
- ✓ Benzocaína *Sigma Aldrich*; Lote: SLBN6895V;
- ✓ Bondesil PSA *Agilent Technologies* 40 µm, Part nº 12213024; Lote: 6345820-01;
- ✓ Declorinizador *AquaSafe TetraAqua*; Lote: 378428;
- ✓ Farmaflor contendo florfenicol a 30% (m/m); Lote: A15/0007JA
- ✓ Filtro: PVDF 0,22 µm, 13 mm Unicrom; Part nº UC2202213-100CW;
- ✓ Seringa *Hamilton Gas tight* 1725 RNR 250 µL Part nº 81165/00 WO: 1340937;
- ✓ Seringa 1 mL *Injex*; Lote: 7665/14;
- ✓ Seringa 3 mL-Slip viel Jet; Lote: 10577;
- ✓ Sorvente DSC-18 Supelco *Sigma Aldrich*; Lote: 6782101;
- ✓ Sulfato de magnésio anidro >99,5% *Sigma Aldrich*; PC code: 1002401911;
- ✓ Sulfato de sódio anidro *Hexis*; Lote: X04595;
- ✓ Teste de amônia tóxica Labcon; Lote: 00160;
- ✓ Teste de cloro Labcon; Lote: 00157;
- ✓ Teste de dureza total Labcon; Lote: GH067;
- ✓ Tubos de centrifuga 50 mL polipropileno *Corning*;
- ✓ Vial de vidro transparente de 2 mL com rosca, 9 mm, com tarja, *CLEAR* com tampa azul e septo de PTFE/Silicone Analítica.

### 3.1.3. PADRÕES

- ✓ Florfenicol amina - padrão analítico 32492 *Sigma Aldrich*;
- ✓ Florfenicol - padrão analítico F1427 *Sigma Aldrich*.

### 3.1.4. COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

- ✓ Coluna Lichrocart C<sub>8</sub> HPLC, *Cartridge Purospher Star*, 4,6 × 250 mm, diâmetro de partícula (d.p.) 5 µm; Lote nº FC036118 nº 522352;
- ✓ Coluna XTerra RP<sub>18</sub> Waters 4,6 × 150 mm, 5 µm d.p.; Part nº 186000492; Lote nº 0156342311;

- ✓ Coluna Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> *narrow bore* Agilent 2,1 × 150 mm; 5 µm d.p.; Part nº 993700-902; SN USNM005662;
- ✓ Coluna de guarda Phenomenex; Part nº KJ0-4282.

### 3.1.5. SOLVENTES

- ✓ Acetona *Chromasolv Plus* HPLC 99,9%; 650501-4L; Lote: MKBT2200V;
- ✓ Acetonitrila grau HPLC *gradient basic*; Lote: 3354 15940523;
- ✓ Acetonitrila grau pesticida 4L Media; Lote: 308079R;
- ✓ Clorofórmio PA ACS Vetec, *Sigma Aldrich*; Lote: DCBDO882V;
- ✓ Diclorometano PA ACS ISO 1L *Emsure*; Lote: K46277050505;
- ✓ Metanol grau HPLC *basic Scharlau*; Lote: 3315 16789625.

## 3.2. MÉTODO ANALÍTICO

### 3.2.1. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Inicialmente, foi feita a otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas para a detecção do florfenicol e do florfenicol amina. Foi realizada a infusão direta dos padrões de florfenicol e florfenicol amina na concentração de 1 µg mL<sup>-1</sup>, na ausência e na presença dos modificadores ácido fórmico 0,1% (v/v) e acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup>, variando os solventes orgânicos entre acetonitrila e metanol, nos modos de ionização positivo e negativo.

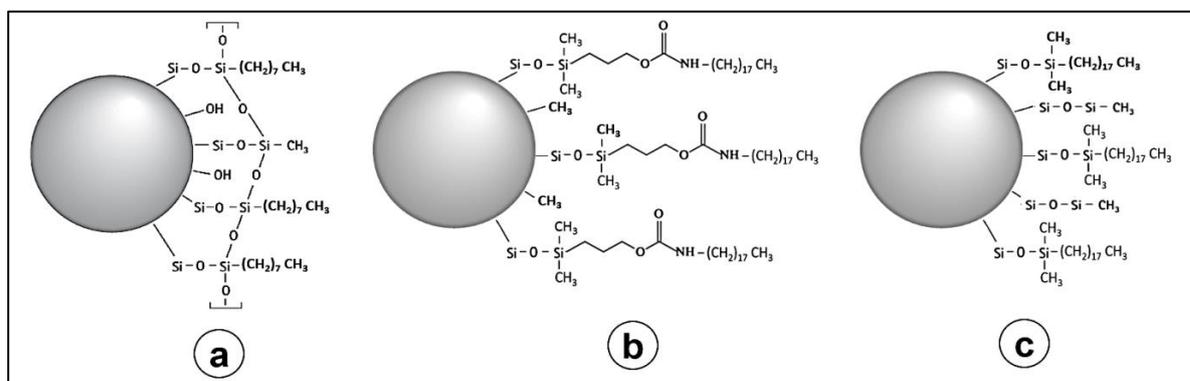
### 3.2.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Foi avaliada a melhor composição da fase móvel para permitir uma separação eficiente, com máxima sensibilidade para detectar os analitos. Soluções padrão de florfenicol e florfenicol amina foram utilizadas para o desenvolvimento do método, na concentração de 1 µg mL<sup>-1</sup>, utilizando três diferentes colunas e proporções de fase móvel, em eluição isocrática e por gradiente, nas melhores condições do espectrômetro de massas. Antes da primeira corrida do dia, as colunas eram condicionadas com 100% de fase orgânica, por meia hora, na vazão estudada.

#### 3.2.2.1. Colunas

Foram avaliadas três colunas e a Figura 8 mostra a estrutura química das fases estacionárias: **Coluna 1:** Coluna Lichrocart C<sub>8</sub> HPLC Cartridge Purospher Star

Merck, de 4,6 mm de diâmetro interno (d.i.), 250 mm de comprimento e d.p. de 5  $\mu\text{m}$ ; **Coluna 2:** Coluna XTerra RP<sub>18</sub> Waters, com 4,6 mm d.i., 150 mm de comprimento e 5  $\mu\text{m}$  d.p.; e **Coluna 3:** Coluna Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> Agilent, com 2,1 mm d.i., 150 mm de comprimento e 5  $\mu\text{m}$  d.p.



**Figura 8.** Fases estacionárias: **(a)** C<sub>8</sub> HPLC Cartridge Purospher Star, Merck; **(b)** XTerra RP<sub>18</sub>, Waters; **(c)** Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>, Agilent.

A coluna Lichrocart C<sub>8</sub> tem cadeias menos apolares devido ao menor número de carbonos na cadeia e possui maior comprimento de coluna (250 mm) em relação às colunas C<sub>18</sub> utilizadas (150 mm). A coluna C<sub>18</sub> X-Terra possui grupos metila e amida, tendo base nas partículas híbridas de primeira geração e permitindo uso de pH alto nas análises. A coluna Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> possui grupos metila e O-Si-CH<sub>3</sub>, com ligantes organosilanos para recobrir os silanois residuais, suportando pH baixo (2-3) a intermediário (6-8). Em comparação às colunas C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub> X-Terra, a coluna orbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> possui partículas de tamanho menor (2,1 mm).

Para verificar a conformidade do sistema cromatográfico na determinação do FF e FFA, são calculados parâmetros cromatográficos como resolução (*Equação 2*), fator de retenção (*Equação 3*), número de pratos (*Equação 4*), fator de assimetria (*Figura 9 e Equação 5*) e de separação (*Equação 6*).

$$R_s = \frac{(t_{R1} - t_{R2})}{0,5 \times (w_{B1} + w_{B2})} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que  $t_R$  = tempo de retenção

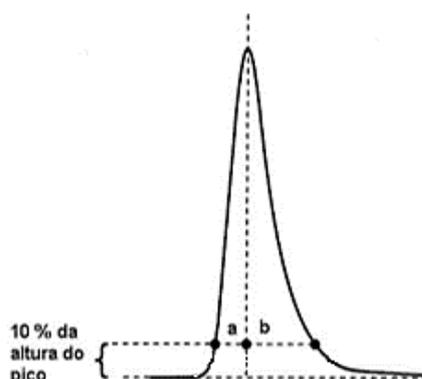
$w_B$  = largura de pico na base

$$\text{Fator de retenção } (k) = \frac{t'_R}{t_M} \quad (\text{Equação 3})$$

Em que:  $t'_R$  = tempo de retenção ajustado =  $t_R - t_M$

$t_M$  = tempo de retenção de um componente não retido pela fase estacionária

$$\text{Número de pratos } (N) = \frac{16 t_R^2}{w_b^2} \quad (\text{Equação 4})$$



**Figura 9.** Pico cromatográfico dividido em a e b a 10% da altura de pico para cálculo do fator de assimetria.

$$\text{Fator de assimetria } (As_{10}) = \frac{b}{a} \quad (\text{Equação 5})$$

$$\text{Fator de separação } (\alpha) = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (\text{Equação 6})$$

Em que:  $t'_{R2}$  = tempo de retenção ajustado do composto mais retido

$t'_{R1}$  = tempo de retenção ajustado do composto menos retido

### 3.2.2.2. Fase móvel

Foram avaliadas as fases móveis compostas por ácido fórmico 0,1% (v/v) (A): acetonitrila (B) e ácido fórmico 0,1% (v/v) (A): metanol (C), nos modos isocrático e gradiente. Essas composições foram estabelecidas de acordo com trabalhos citados na literatura [32, 40, 70]. Iniciou-se com a eluição isocrática 40% A: 60% B ou C, 50% A: 50% B ou C, 70% A: 30% B ou C e 90% A e 10%B ou C. No modo gradiente, foram testadas as seguintes composições, utilizando somente a acetonitrila (B) como solvente orgânico: **Gradiente 1:** 90% A e 10% B de 0,1 - 6,0 min, 20% A e 80% B de 6,1 - 8,0 min e 90% A e 10% B de 8,1 - 10,0 min; **Gradiente 2:** 90% A e 10% B de 0,1 - 6,0 min, 20% A e 80% B de 6,1 - 10,0 min e 90% A e

10% B de 10,1 - 15,0 min; **Gradiente 3:** 70% A e 30% B de 0,1 - 7,0 min, 0% A e 100% B de 7,1 - 9,0 min e 70% A e 30% B de 9,1 - 18,0 min; **Gradiente 4:** 70% A e 30% B de 0,1 - 7,0 min, 0% A e 100% B de 7,1 - 15,0 min e 70% A e 30% B de 15,1 - 23,0 min. Foram avaliadas diferentes temperatura da coluna ( $T = 30$  e  $40$  °C), volumes de injeção ( $V = 5, 10, 15$  e  $20$   $\mu\text{L}$ ) e vazões de fase móvel ( $F = 300$  e  $500$   $\mu\text{L min}^{-1}$ ).

### 3.2.2.3. Volume de injeção

Para selecionar o melhor volume de injeção, foram construídas curvas analíticas a 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 LMR para cada volume de injeção ( $V = 5, 10, 15$  e  $20$   $\mu\text{L}$ ) e foram comparados os coeficientes de correlação.

### 3.2.3. PREPARO DA AMOSTRA - MÚSCULO DE TILÁPIA

Foram testadas três técnicas de extração, DLLME, sub-zero e QuEChERS, e as variáveis de cada técnica foram otimizadas, a fim de obter uma recuperação adequada para o FF e o FFA no músculo de tilápia. As amostras de tilápia utilizadas como branco foram obtidas na Embrapa, criadas sem a presença do florfenicol. As tilápias foram eutanasiadas com exposição à benzocaína ( $65$   $\text{mg L}^{-1}$ ) na água para provocar anestesia com perda dos reflexos, seguida por secção medular. O músculo foi separado da pele, homogeneizado em processador e estocado em freezer em embalagens plásticas, seguindo as especificações da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA). [71]

#### 3.2.3.1. DLLME

Inicialmente foi avaliada a técnica DLLME devido à facilidade de execução e potencialidade como técnica miniaturizada. Essa técnica foi avaliada com 4 modificações. Os testes foram feitos na matriz branco de músculo de tilápia fortificada (Figura 10). Foi construída uma curva analítica no extrato da matriz branco fortificado com 5 concentrações de florfenicol e florfenicol amina ( $0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 3 réplicas por nível. Para o teste de recuperação,  $1,00$  g da amostra foi pesado em triplicata em tubos de centrífuga de polipropileno ( $50$  mL). Foram adicionados os volumes dos padrões de florfenicol e de florfenicol amina na concentração de  $1,0$   $\mu\text{g g}^{-1}$  e os tubos foram agitados em *vortex* por 1 minuto.

Depois foram testados quatro métodos DLLME (variando solventes dispersor nos dois primeiros, em **a**, e o extrator, nos dois últimos, em **b**):

**a)** Adicionaram-se 10 mL de solvente dispersor acetona (**DLLME\_1**) ou acetonitrila (**DLLME\_2**) no tubo contendo a matriz branco fortificada e os tubos foram agitados por mais 1 minuto. Foram adicionados 3,0 g de sulfato de sódio e os tubos foram agitados por mais 1 minuto e centrifugados a 3,000 × g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido para tubos de centrífuga de polipropileno e ficaram no freezer por 2 horas a -20 °C para deposição de lipídeos. Um mL do sobrenadante foi recolhido para um tubo de centrífuga de polipropileno contendo 1 mL de água deionizada. Foram injetados, rapidamente, 250 µL de solvente extrator clorofórmio, com uma seringa, para formar um jato de gotículas na fase aquosa. Os tubos foram agitados por 1 minuto e centrifugados a 3,000 × g por 5 minutos.

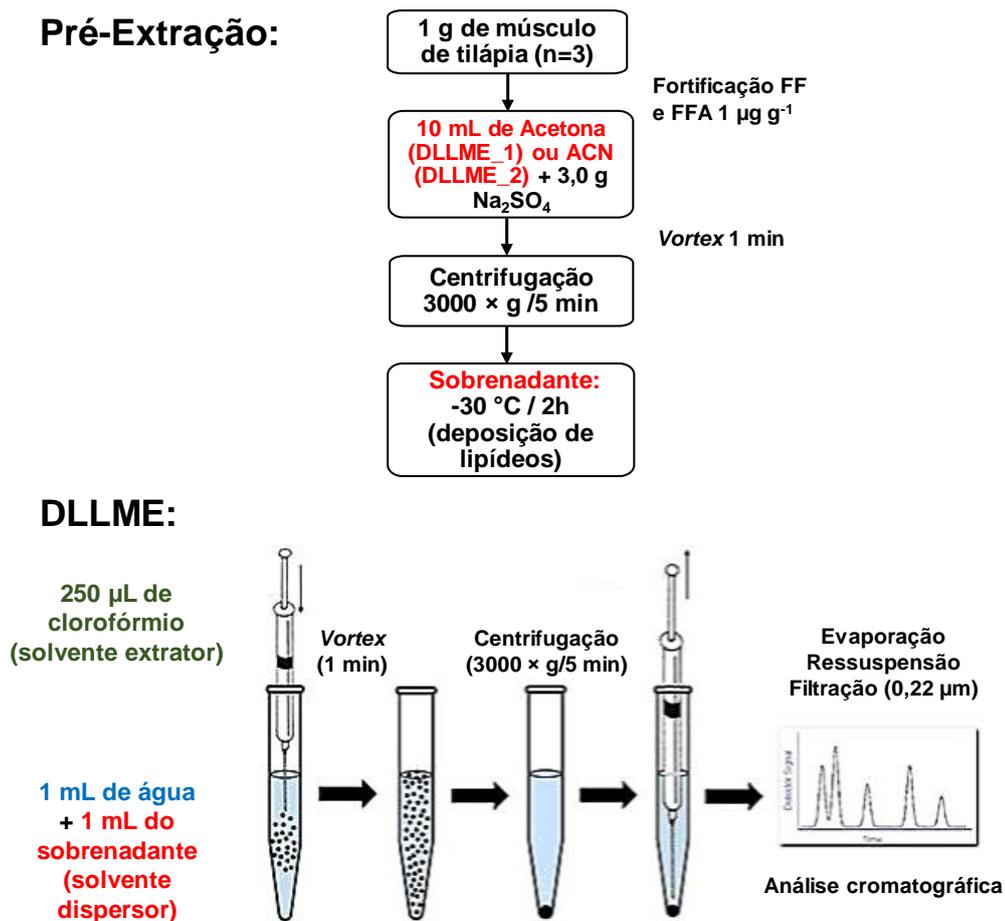
**b)** Adicionaram-se 5 mL de solvente dispersor (acetonitrila) no tubo contendo a matriz branco fortificada e os tubos foram agitados por mais 1 minuto. Foram adicionados 2,0 g de sulfato de magnésio e 50 mg de C<sub>18</sub> para remoção de lipídeos e eliminação da etapa em freezer. Os tubos foram agitados por mais 1 minuto e centrifugados a 3,000 × g por 5 minutos. Um mL do sobrenadante foi recolhido para um tubo de centrífuga de polipropileno contendo 2 mL de água deionizada. Foram adicionados 250 µL de solvente extrator, rapidamente. Foram avaliados dois solventes extratores, clorofórmio (**DLLME\_3**) [72] e diclorometano (**DLLME\_4**). [73] Os tubos foram deixados no ultrassom por 1 minuto e centrifugados a 3,000 × g por 5 minutos.



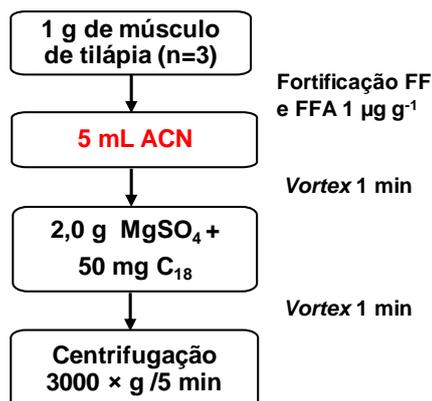
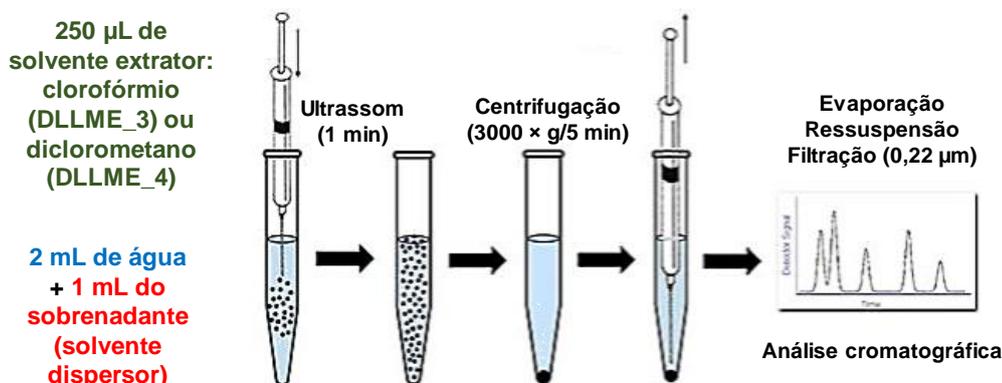
**Figura 10.** Extração do FF e do FFA do músculo de tilápia por DLLME: **(a)** Músculo de tilápia branco; **(b)** Músculo de tilápia processado e homogeneizado; **(c)** 1,0 g de músculo de tilápia + 5,0 mL de acetonitrila + 2,0 g de sulfato de magnésio + 50 mg de C<sub>18</sub>; **(d)** Agitação por 1 min; **(e)** Centrifugação 3000 × g por 5 minutos; **(f)** Sobrenadante; **(g)** Adição do solvente extrator; **(h)** Ultrassom; **(i)** Secagem do extrato em N<sub>2</sub>, ressuspensão na fase móvel e injeção no LC-MS/MS; **(j)** Espectrômetro de massas Ion trap (MS/MS - IonTrap), modelo amaZon X; **(k)** Cromatógrafo a líquido (HPLC) UFLC Shimadzu LC20AT.

A etapa a seguir foi igual para os quatro métodos, a fase sedimentada foi removida e seca em nitrogênio, ressuspensa na fase móvel (água: acetonitrila, ambas com 0,1% ácido fórmico, 40:60 v/v), filtrada a 0,22 µm e injetada no sistema cromatográfico. A avaliação da recuperação foi realizada comparando-se os resultados da matriz branco fortificada antes da extração na concentração de 1,0 µg g<sup>-1</sup>, em triplicata, em relação às áreas da curva no extrato da matriz branco fortificado após a extração. Um esquema dos métodos DLLME de 1 a 4 estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

Fortificou-se também com florfenicol e florfenicol amina 1 µg g<sup>-1</sup>, amostras de água deionizada em diferentes pHs (6, 7 e 8), utilizando o ácido clorídrico e o hidróxido de amônio, ambos na concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup>, para verificar o melhor pH para a extração do florfenicol amina. Após esse teste, foi realizado a fortificação da matriz branco de músculo de tilápia e extração por DLLME com clorofórmio como solvente extrator e acetonitrila como solvente dispersor, utilizando a fase aquosa em pH 6,97 e 7,67.



**Figura 11.** Extração do FF e FFA do músculo de tilápia por DLLME variando o solvente dispersor entre acetona e acetonitrila.

**Pré-Extração:****DLLME:**

**Figura 12.** Extração do FF e FFA do músculo de tilápia por DLLME variando o solvente extrator entre clorofórmio e diclorometano e com adição de C<sub>18</sub> na pré-extração.

**3.2.3.2. Sub-Zero**

Foi testada a técnica de extração sub-zero (**Sub-zero**), que consiste no congelamento da água para a separação do solvente extrator acetonitrila. Para isso, foi construída uma curva analítica no extrato da matriz branco fortificado com 5 concentrações de florfenicol e florfenicol amina (0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00 µg mL<sup>-1</sup>), 3 réplicas por nível. Para o teste de recuperação, 1,00 g da amostra foi pesado em triplicata em tubos de centrífuga de polipropileno (50 mL). Foram adicionados os volumes dos padrões de florfenicol e de florfenicol amina na concentração de 1,0 µg g<sup>-1</sup> e os tubos foram agitados em vortex por 1 minuto. Adicionaram-se 5 mL de acetonitrila, 2,0 g de sulfato de magnésio e 50 mg de C<sub>18</sub> e os tubos foram agitados por mais 1 minuto e centrifugados a 3,000 × g por 5 minutos. Foi recolhido 1 mL do sobrenadante para um tubo de centrífuga de polipropileno contendo 2 mL de água deionizada em pH 7,00. O tubo ficou no freezer por 2 horas a -20 °C para congelamento da água. A fase superior (acetonitrila) contendo os analitos foi

removida, seca em nitrogênio, ressuspensa na fase móvel (água: acetonitrila, ambos com 0,1% ácido fórmico, 40:60 v/v), filtrada em filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  e injetada no sistema cromatográfico.

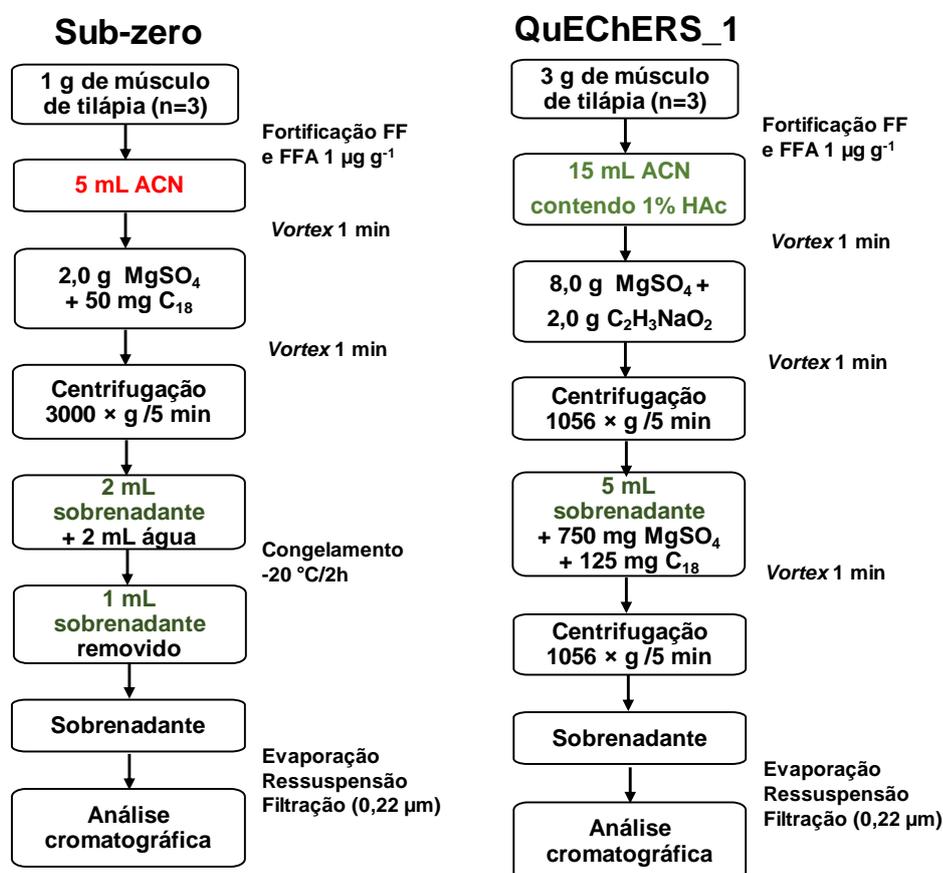
### 3.2.3.3. QuEChERS

Foi testada a técnica de extração QuEChERS (**QuEChERS\_1**), segundo a referência [42] e as condições podem ser vistas na Figura 13. Foi construída uma curva analítica no extrato da matriz branco fortificado com 5 concentrações de florfenicol e florfenicol amina (0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 3 réplicas por nível.



**Figura 13.** Extração do florfenicol do músculo de tilápia por QuEChERS: **(a)** Músculo de tilápia branco; **(b)** Músculo de tilápia processado e homogeneizado; **(c)** 3,0 g de músculo de tilápia + 15,0 mL de acetonitrila com 1% (v/v) de ácido acético; **(d)** 3,0 g de músculo de tilápia + 15,0 mL de acetonitrila com 1% (v/v) de ácido acético + 8,0 g de sulfato de magnésio + 2,0 g de acetato de sódio; **(e)** Agitação por 1 min; **(f)** Centrifugação 1056 x g por 5 minutos; **(g)** Remoção do sobrenadante para um tubo contendo 750 mg de sulfato de magnésio + 125 mg de C<sub>18</sub>; **(h)** Agitação por 1 min; **(i)** Centrifugação 1056 x g por 5 minutos; **(j)** Secagem do extrato em N<sub>2</sub>, ressuspensão na fase móvel e injeção no LC-MS/MS; **(k)** Espectrômetro de massas Ion trap (MS/MS - IonTrap), modelo amaZon X; **(l)** Cromatógrafo a líquido (HPLC) UFLC Shimadzu LC20AT.

Para o teste de recuperação, 3,00 g da amostra foram pesados em triplicata em tubos de centrífuga de polipropileno (50 mL). Foram adicionados os volumes dos padrões de florfenicol e de florfenicol amina na concentração de  $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ . Adicionaram-se 15 mL de acetonitrila contendo ácido acético 1% (v/v) e agitou-se por mais 1 minuto. Foram adicionados 8,0 g de sulfato de magnésio e 2,0 g de acetato de sódio, agitados por 1 min e centrifugados a  $1056 \times g$  por 5 minutos. Foram recolhidos 5 mL do sobrenadante para um tubo de centrífuga de polipropileno (50 mL) contendo 750 mg de sulfato de magnésio e 125 mg de  $C_{18}$ . Foram agitados por 1 minuto e centrifugados a  $1056 \times g$  por 5 minutos. Um mL do sobrenadante foi seco em nitrogênio e ressuspensão na fase móvel (água: acetonitrila, ambas com 0,1% ácido fórmico, 40:60 v/v), filtrados em filtro de  $0,22 \mu\text{m}$  e injetados no sistema cromatográfico. A avaliação da recuperação foi realizada seguindo o mesmo procedimento, para a concentração de  $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ , em triplicata. Esse método QuEChERS foi utilizado como referência para comparação com o QuEChERS modificado avaliado posteriormente. A Figura 14 mostra um fluxograma do preparo de amostra utilizando extração sub-zero e QuEChERS.

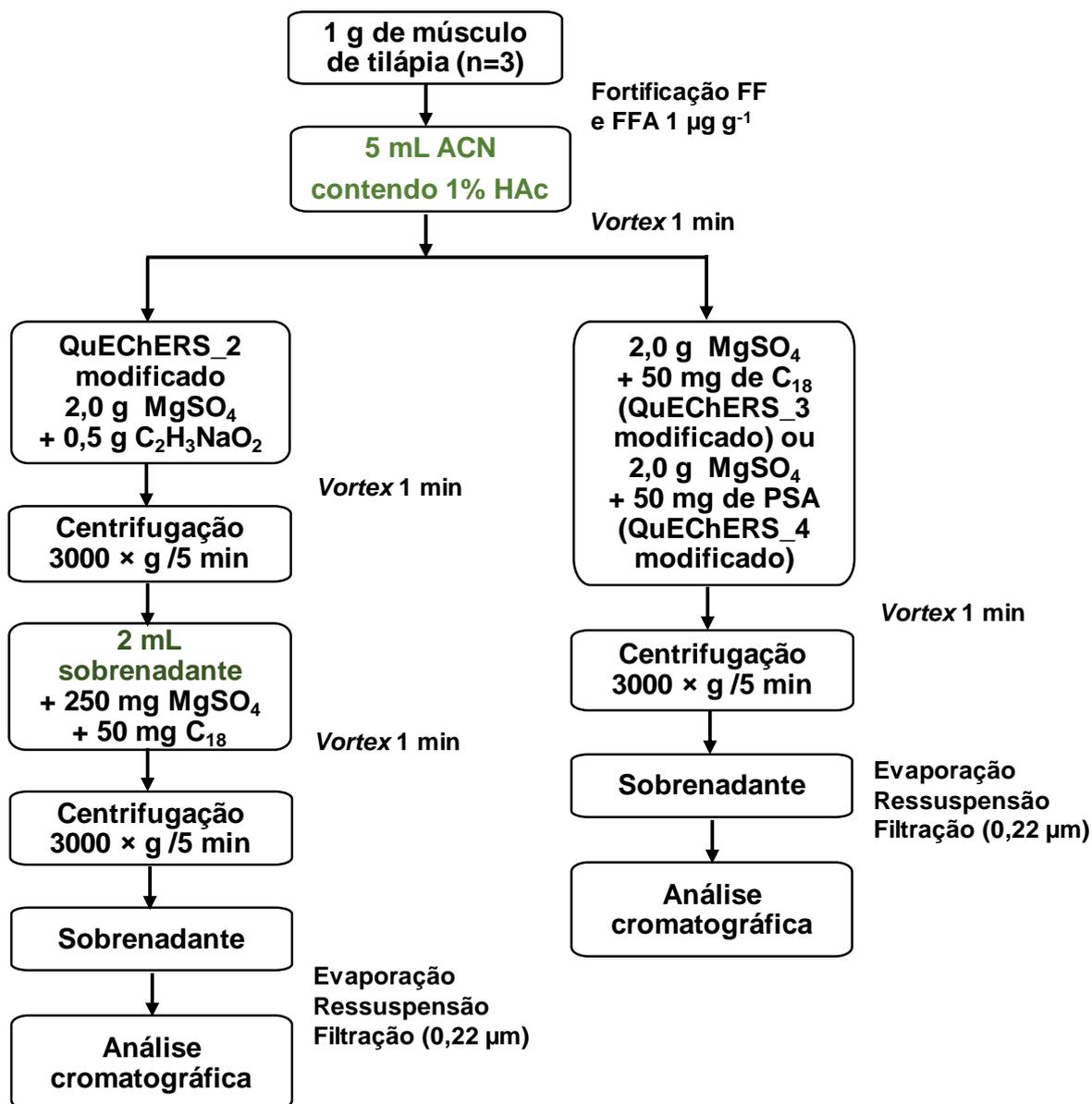


**Figura 14.** Extração do FF e FFA do músculo de tilápia pela extração sub-zero e por QuEChERS\_1.

#### 3.2.3.4. QuEChERS modificado

Foi testada a técnica de extração QuEChERS modificado (Figura 15), na matriz de tilápia branco fortificada. Neste trabalho, o QuEChERS modificado foi utilizado como uma miniaturização do método. Para isso, reduziram-se as quantidades de amostra, solvente e sais utilizados na referência [42]. Foi construída uma curva analítica no extrato da matriz branco fortificado com 5 concentrações de florfenicol e florfenicol amina (0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 3 réplicas por nível. Para o teste de recuperação, 1,00 g da amostra foi pesado em triplicata em tubos de centrífuga de polipropileno (50 mL). Foram adicionados os volumes dos padrões de florfenicol e de florfenicol amina na concentração de 1,0  $\mu\text{g g}^{-1}$  e os tubos foram agitados em *vortex* por 1 minuto. Adicionaram-se 5 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético (v/v) e os tubos foram agitados por mais 1 minuto.

Foram testadas três modificações. **QuEChERS\_2 (modificado)**: adição de 2,0 g de sulfato de magnésio e 0,5 g de acetato de sódio, agitados por 1 min e centrifugados a 3000  $\times$  g por 5 minutos. Foram recolhidos 2 mL do sobrenadante para um tubo de centrífuga de polipropileno (50 mL) contendo 250 mg de sulfato de magnésio e 50 mg de C<sub>18</sub>. Foram agitados por 1 minuto e centrifugados a 3000  $\times$  g por 5 minutos; **QuEChERS\_3 (modificado)**: adição de 2,0 g de sulfato de magnésio e 50 mg de C<sub>18</sub>, agitados por 1 min e centrifugados a 3000  $\times$  g por 5 minutos; **QuEChERS\_4 (modificado)**: adição de 2,0 g de sulfato de magnésio e 50 mg de PSA, agitados por 1 min e centrifugados a 3000  $\times$  g por 5 minutos. Para os três métodos, 1 mL do sobrenadante foi seco em nitrogênio e ressuspenso em 500  $\mu\text{L}$  de fase móvel (água: acetonitrila, ambos com 0,1% de ácido fórmico, 40:60 v/v), filtrados a 0,22  $\mu\text{m}$  e injetados no sistema cromatográfico.



**Figura 15.** Extração do FF e FFA do músculo de tilápia por QuEChERS\_2, QuEChERS\_3, QuEChERS\_4, variando os sorventes entre C<sub>18</sub> e PSA.

### 3.2.4. PREPARO DA AMOSTRA - ÁGUA DE EXPOSIÇÃO DA TILÁPIA

Para o preparo da amostra da água que continha as tilápias, somente foi realizado uma diluição da amostra em dez vezes, pois a concentração de florfenicol adicionada na água foi de 10 µg mL<sup>-1</sup>. A curva analítica foi construída com FF e FFA nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00 µg mL<sup>-1</sup>, adicionando 10% de amostra de água de exposição dos aquários controle (sem adição de florfenicol na água) a 90% da fase móvel. As amostras foram filtradas a 0,22 µm e injetadas no sistema cromatográfico.

### 3.3. VALIDAÇÃO

O método com os melhores valores de recuperação foi validado seguindo os guias de validação do MAPA e da Comunidade Europeia. [34, 35] Na validação de resíduos de fármacos veterinários em alimentos de origem animal são avaliadas a estabilidade, efeito matriz, seletividade, linearidade, exatidão, precisão, LD, LQ, CC $\alpha$  e CC $\beta$ .

#### 3.3.1. ESTABILIDADE DOS PADRÕES

##### 3.3.1.1. Solução

Preparou-se uma solução de florfenicol na concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e florfenicol amina na concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para o florfenicol, 10 mg do padrão analítico foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL e avolumado com acetonitrila. Para o florfenicol amina, 0,5 mg foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL e avolumado com acetonitrila. As soluções foram armazenadas em frasco âmbar e mantida sob refrigeração a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por até 45 dias. Para o teste de estabilidade, as soluções mãe foram diluídas nas concentrações de 0,20, 0,40, 0,60, 0,80, 1,00, 1,20, 1,40, 1,60, 1,80 e 2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , de forma a ter 10 alíquotas com concentrações ao redor do LMR. Essas alíquotas foram armazenadas de acordo com a Tabela 3. [34]

**Tabela 3.** Determinação da estabilidade de uma substância em solução.

<b>Armazenamento</b>	<b>-20 °C</b>	<b>+ 4 °C</b>	<b>+20 °C</b>
Escuro	10 alíquotas	10 alíquotas	10 alíquotas
Claro	-	-	10 alíquotas

As concentrações foram medidas nessas soluções após 1, 2, 3, 4, 5 e 6 semanas para se determinar as condições ótimas de armazenamento.

##### 3.3.1.2. Matriz biológica

Analisou-se a matriz branco fortificada com florfenicol e florfenicol amina nas concentrações de 0,25 e 1,0 LMR, em triplicata. Comparou-se com os resultados obtidos após 1, 2 e 4 semanas de estocagem em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.2. SELETIVIDADE

A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas da matriz branco sem fortificação e da matriz branco fortificada no menor nível de concentração da curva analítica, 0,25 LMR, ambas submetidas ao mesmo preparo de amostra.

### 3.3.3. EFEITO MATRIZ

Para a determinação do efeito matriz, as curvas analíticas foram construídas no solvente (água: acetonitrila, ambas com ácido fórmico 0,1%, A:B 40:60 v/v) e no extrato da matriz branco fortificados com o florfenicol e o florfenicol amina nas concentrações de 0,0; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Cada nível foi realizado em triplicata e em duplicata de injeção. [35] O efeito matriz foi avaliado comparando-se a curva analítica construída em solvente com a curva realizada no extrato da matriz branco fortificado e calculado segundo a *Equação 7*:

$$\text{Efeito Matriz} = \left[ \left( \frac{\text{Área}_{\text{Extrato fortificado}}}{\text{Área}_{\text{Padrão no Solvente}}} \right) \times 100 \right] - 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Outra maneira de determinar o efeito matriz foi comparando três níveis de fortificação, com o florfenicol e o florfenicol amina nas concentrações de 0,50; 1,00 e 1,50 LMR, preparados no solvente e no extrato da matriz branco, em sextuplicata por nível. [35] O efeito matriz foi avaliado pelo teste F (*Equação 8*):

$$F_{\text{calc},i} = \frac{s_{i,1}^2}{s_{i,2}^2} \quad (\text{Equação 8})$$

em que:  $s_{i,1}^2$  e  $s_{i,2}^2$  = variâncias das sextuplicatas das amostras não matricadas e matricadas, em cada concentração, com a maior variância no numerador.

Obteve-se o valor crítico tabelado de  $F_{\text{crit},\alpha,\nu_{i1},\nu_{i2}}$ , com  $\nu_{i,1} = n_{i,1} - 1 \geq 5$  e  $\nu_{i,2} = n_{i,2} - 1 \geq 5$  graus de liberdade no numerador e denominador, respectivamente, ao nível de significância  $\alpha = 0,05$  (5%). Se  $F_{\text{calc},i} < F_{\text{crit},\alpha,\nu_{i1},\nu_{i2}}$ , as variâncias desse nível de concentração podem ser consideradas iguais e a matriz não tem efeito importante sobre a precisão do método nesse nível de fortificação considerado. Os desvios-padrão desses dois grupos de análises podem ser agrupados e a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada com a distribuição *t* de Student (*Equação 9*):

$$t_{alc,i} = \frac{|\bar{x}_{i,1} - \bar{x}_{i,2}|}{\sqrt{s^2 \left( \frac{1}{n_{i,1}} + \frac{1}{n_{i,2}} \right)}} \quad (\text{Equação 9})$$

$$\text{em que: } s^2 = \frac{(n_{i,1}-1)s_{i,1}^2 + (n_{i,2}-1)s_{i,2}^2}{(n_{i,1} + n_{i,2} - 2)}$$

$n_{i,1}$  e  $n_{i,2}$  = números de replicatas nas amostras não matrizada e matrizada

$\bar{x}_{i,1} - \bar{x}_{i,2}$  = médias das concentrações do analito em extrato e em solvente puro em cada nível de concentração.

$s_{i,1}^2$  e  $s_{i,2}^2$  = desvios-padrão das concentrações do analito no  $i$ -ésimo nível de fortificação.

Compararam-se as médias das concentrações do analito em extrato da matriz branca fortificado e em solvente puro. O valor crítico tabelado de  $t_{crit,\alpha,\nu}$ ,  $\alpha, n$  foi obtido para cada nível, a partir da tabela de distribuição de Student para ( $n_i = n_{i,1} + n_{i,2} - 2$ ) graus de liberdade e nível de significância  $\alpha = 0,05$  (5%). Se em um dado nível de concentração  $i$  o valor de  $F_{calc,i} > F_{crit,\alpha,\nu1,\nu2}$ , as variâncias não podem ser consideradas estatisticamente iguais no nível de fortificação  $i$  considerado. Se o valor de  $t_{calc,i} < t_{crit,\alpha,n}$ , a matriz não afeta o ensaio no  $i$ -ésimo nível de fortificação. Se o valor de  $t_{calc,i} > t_{crit,\alpha,n}$ , a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado. Para a aceitação da não existência de efeito matriz, não deve haver efeito matriz em nenhum nível de concentração. [35]

### 3.3.4. FAIXA LINEAR E LINEARIDADE

Para a determinação da faixa linear e da linearidade, as curvas analíticas foram construídas no solvente e no extrato da matriz branco fortificadas com o florfenicol e o florfenicol amina nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Na matriz branco, as fortificações com florfenicol e o florfenicol amina foram nas concentrações de 0,63; 1,25; 2,50; 3,75 e 5,00  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Cada nível foi realizado em triplicata e em duplicata de injeção ( $n=30$  pontos na curva, 6 por nível de concentração). [35]

A linearidade foi avaliada pela regressão linear calculada pelo método dos mínimos quadrados ordinários. Foram obtidos os coeficientes  $a$ ,  $b$  e  $r$  (coeficiente de correlação linear). [34]

### 3.3.5. PRECISÃO

A precisão intradia (repetibilidade) do método foi obtida realizando teste de recuperação em sextuplicata para os três níveis de fortificação de 0,5, 1,0 e 1,5 LMR. A precisão interdica (precisão intermediária ou reprodutibilidade intralaboratorial) foi obtida da mesma forma que a repetibilidade, mas em dois dias diferentes, totalizando em 18 ensaios por nível de fortificação de 0,5, 1,0 e 1,5 LMR. [35] A precisão foi calculada pelo desvio padrão relativo (RSD, do inglês, *relative standard deviation*) ou coeficiente de variação (CV), de acordo com as *Equações 10* e 11:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (\text{Equação 10})$$

$$RSD \text{ ou } CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 11})$$

em que:  $s$  = estimativa de desvio padrão

$x_i$  = valor de uma medida

$\bar{x}$  = média das replicatas

$n$  = número de medidas

### 3.3.6. EXATIDÃO

Como não estava disponível um material de referência certificado, a exatidão foi avaliada por testes de recuperação, utilizando uma curva analítica construída no extrato de músculo de tilápia fortificado com florfenicol e florfenicol amina após a extração, nas concentrações de 0,25 a 2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A recuperação foi obtida fortificando em sextuplicata a matriz branco antes da extração em três níveis de fortificação, 0,5, 1,0 e 1,5 LMR. [35] Com as áreas obtidas pelas amostras foram calculadas as concentrações (*Equação 12*) e as recuperações (*Equação 13*).

$$\text{Área} = a [\text{Concentração}] + b \quad (\text{Equação 12})$$

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração obtida pela área}}{\text{nível de fortificação } (\mu\text{g g}^{-1})} \times 100 \quad (\text{Equação 13})$$

em que:  $a$  = Coeficiente angular da equação da curva analítica

$b$  = Coeficiente linear da equação da curva analítica

### 3.3.7. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO E DE DETECÇÃO

O LQ foi estimado utilizando amostras branco fortificadas ( $n=6$ ), em diferentes níveis de concentração até que o nível mais baixo estivesse com relação sinal/ruído superior a seis ( $S/R \geq 6$ ). O LQ foi determinado quando o nível mais baixo de concentração atendesse os critérios de recuperação e precisão, conforme recomendação do MAPA, que preconiza recuperações na faixa de 70 a 110% e precisão com coeficiente de variação de até 20%, para a concentração trabalhada. [35] O LD foi estimado utilizando amostras branco fortificadas ( $n=6$ ), em diferentes níveis de concentração até que o nível mais baixo estivesse com relação sinal/ruído superior a três ( $S/R \geq 3$ ).

### 3.3.8. LIMITE DE DECISÃO E CAPACIDADE DE DETECÇÃO

Para obter o  $CC_\alpha$  e o  $CC_\beta$ , foram analisadas 20 amostras da matriz branco fortificada com o florfenicol no LMR ( $1 \mu\text{g g}^{-1}$ ). De acordo com a Comunidade Europeia, para o cálculo do  $CC_\beta$ , deveriam ser fortificadas 20 amostras da matriz branco no valor de  $CC_\alpha$ . [34] Porém, para simplificar o método, o MAPA adotou calcular os dois parâmetros com a fortificação de 20 amostras da matriz branco também no LMR, visto que os valores de LMR e  $CC_\alpha$  são muito próximos. [35] Os parâmetros foram calculados de acordo com as *Equações 14 e 15*. [34]

$$CC_\alpha = LMR + 1,64 \sigma \quad (\text{Equação 14})$$

$$CC_\beta = CC_\alpha + 1,64 \sigma \quad (\text{Equação 15})$$

em que:  $\sigma$  = Desvio padrão das 20 medidas

Esses dois parâmetros foram introduzidos pela Comunidade Europeia, sendo que o  $CC_\beta$  é mais utilizado para triagem, quando se quer processar muitas amostras em pouco tempo para detectar a presença do composto e eleger amostras não conformes. Nos métodos de confirmação, são exigidos tanto o  $CC_\alpha$  quanto o  $CC_\beta$ . O  $CC_\alpha$  é mais importante, pois determina a concentração a partir da qual se considera uma amostra não conforme, com uma probabilidade de erro de  $\alpha$ . O erro  $\alpha$  é a probabilidade de uma amostra analisada ser conforme apesar de se ter obtido um resultado não conforme (falsa decisão não conforme). [34]

O  $CC_\beta$  é o teor mais baixo de substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro de  $\beta$ . O erro  $\beta$  é a probabilidade de uma amostra analisada ser não conforme, apesar de se ter obtido

um resultado conforme (falsa decisão conforme). [34] Os erros  $\alpha$  e  $\beta$  estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultado do teste de hipótese para resíduos e contaminantes e a presença de falsos positivo e negativo.

Teste de hipótese		Resíduos e contaminantes	
		Ausente	Presente
Resultado do teste	Negativo	Verdadeiro Negativo	Falso Negativo (erro $\beta$ )
	Positivo	Falso Positivo (erro $\alpha$ )	Verdadeiro Positivo

### 3.4. ENSAIOS DE BIOCONCENTRAÇÃO

O ensaio de bioconcentração foi realizado para determinar os resíduos das moléculas em função do tempo de exposição dos peixes na água contendo florfenicol na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>. Esse estudo permitiu determinar o fator de bioconcentração e também estudar a redução dos níveis dos tecidos (período de depleção) quando cessa tal exposição.

#### 3.4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

As 101 tilápias utilizadas para a matriz branco para o desenvolvimento e validação do método foram obtidas na Embrapa. As 160 tilápias que foram utilizadas para os ensaios de bioconcentração foram obtidas da piscicultura Polettini em Mogi Mirim. Todos os peixes utilizados foram criados sem a presença do florfenicol. Foram utilizados 80 peixes como controle, sem exposição ao banho com florfenicol e, 80 peixes foram expostos ao banho de imersão contendo 10 mg L<sup>-1</sup> de florfenicol. As tilápias foram eutanasiadas com exposição à benzocaína (65 mg L<sup>-1</sup>) na água para provocar anestesia com perda dos reflexos, seguida por secção medular. O tecido muscular foi separado da pele, homogeneizado em processador e estocado em freezer em embalagens plásticas, seguindo as especificações da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA). [71]

#### 3.4.2. MÉTODO

O estudo foi fundamentado no protocolo da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) 305. [74] Inicialmente, foi realizada a aclimatação, na qual os peixes permaneceram nas mesmas condições ambientais e

de alimentação em que se procedeu o estudo, por duas semanas. Durante o período de aclimatação, os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial, isenta de fármaco, na proporção de 1–2% do peso corpóreo.

Inicialmente, todos os peixes foram dispostos em um tanque plástico para verificar se tinham alguma anormalidade, doença ou parasitoses. Após uma semana, foi realizada a biometria dos peixes (Figura 16), obtendo-se o peso e o comprimento de cada um. De acordo com o peso, os peixes foram alocados em 10 aquários de vidro (50 × 120 × 50 cm), contendo volume útil de 300 L cada, de forma a obter o menor desvio padrão entre eles e uma amostra homogênea. Foram utilizados 16 peixes por aquário, sendo 5 aquários para tratamento com florfenicol 10 mg L<sup>-1</sup> e 5 para controle.

Diariamente foram medidos a temperatura da água (°C), o oxigênio dissolvido (mg L<sup>-1</sup>), a condutividade (μS cm<sup>-1</sup>) e o pH com a sonda Horiba. A cada semana determinou-se o nitrogênio amoniacal total por meio do teste 8155 Hach, nitrito N (NO<sub>2</sub> N) e do teste 8153 Hach e nitrato N (NO<sub>3</sub> N) teste 8158 Hach.



**Figura 16.** (a) Piscicultura Poletini; (b) Tanque onde as tilápias foram criadas na piscicultura; (c) Sacos plásticos utilizados no transporte das tilápias da piscicultura até a Embrapa; (d) Tanque em que as tilápias ficaram aclimatadas por uma semana; (e) Filtros, bomba de aerção e termopares adaptados ao tanque para manutenção da qualidade da água, oxigênio dissolvido e temperatura adequados; (f) Biometria para medida do comprimento da tilápia; (g) Pesagem da tilápia; (h) Aquário com 16 tilápias para o experimento, agrupadas de acordo com o peso.

A concentração de florfenicol foi de 1/100 da CL<sub>50-96h</sub> (1000 mg L<sup>-1</sup>), sendo de 10 mg L<sup>-1</sup> de florfenicol em água. Durante a fase de exposição ao fármaco

(assimilação) foram realizadas coletas da água e dos peixes às 0, 1,5; 3; 6; 24 e 48 horas para análise da concentração do florfenicol no músculo e na água.

Na fase de depuração, os peixes remanescentes nos aquários contendo 10 mg L<sup>-1</sup> de florfenicol foram removidos e transferidos para outros aquários contendo água isenta do fármaco. A água era recirculada através de filtros contendo carvão ativo para promover a depuração do florfenicol do tecido do peixe para a água. O carvão ativo foi utilizado para a remoção do fármaco da água e para evitar a reabsorção do composto pelos peixes. Foram realizadas coletas às 1,5; 3; 6; 24, 48 e 120 horas.

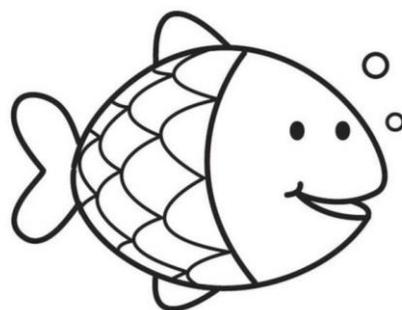
Para a análise de resíduos nos peixes, 5 organismos foram amostrados em cada período descrito acima, coletando 1 organismo de cada aquário, o que permitiu a análise de resíduos no músculo em quintuplicata por período. A análise de resíduos foi realizada com o método desenvolvido e validado neste trabalho.

---

# CAPÍTULO IV.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

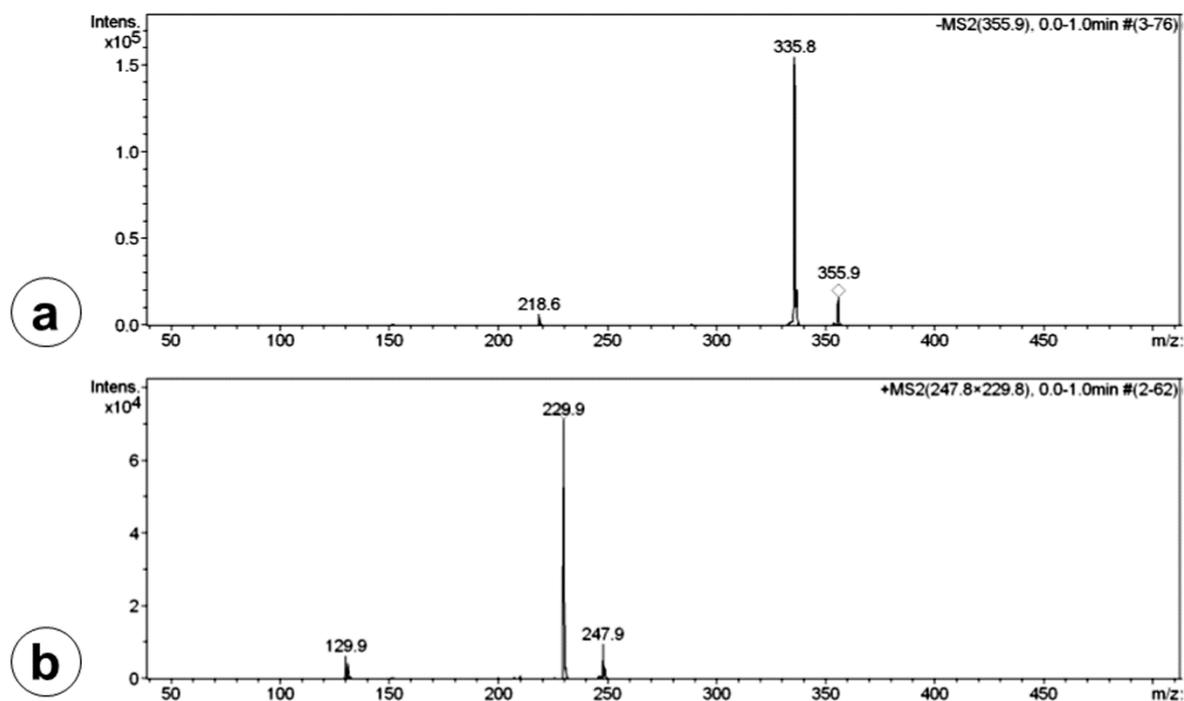


## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS

#### 4.1.1. ESPECTRÔMETRO DE MASSAS SEQUENCIAL

Após realizar a infusão direta dos padrões de florfenicol e florfenicol amina na ausência de modificador e na presença dos modificadores ácido fórmico 0,1% (v/v) e acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup> em água, nos modos positivo e negativo, verificou-se que o modificador ácido fórmico 0,1% em acetonitrila proporcionou respostas com maiores intensidades. Quanto à polaridade, o modo negativo forneceu melhor resultado para o florfenicol e o modo positivo para o florfenicol amina. O espectro de massas para os dois compostos na concentração de 1 µg mL<sup>-1</sup> utilizando o solvente acetonitrila e o modificador ácido fórmico 0,1% (v/v) estão apresentados na Figura 17. As condições do espectrômetro de massas foram: voltagem do capilar de 4,5 kV, pressão do gás nebulizador de 40 psi, vazão do gás de secagem de 9 L min<sup>-1</sup>, temperatura da fonte em 300 °C e varredura de *m/z* 50 a 500. Os íons e fragmentos monitorados estão apresentados na Tabela 5.



**Figura 17. (a)** Espectro de massas no modo negativo da infusão direta do florfenicol 1 µg mL<sup>-1</sup> em acetonitrila fortificado com ácido fórmico 0,1%; **(b)** Espectro de massas no modo positivo da infusão direta do florfenicol amina 1 µg mL<sup>-1</sup> em acetonitrila fortificado com ácido fórmico 0,1%. Condições do espectrômetro de massas: Voltagem do capilar = 4,5 kV, pressão do gás nebulizador = 40 psi, vazão do gás de secagem = 9 L min<sup>-1</sup>, temperatura da fonte = 300 °C e varredura de *m/z* 50 a 500.

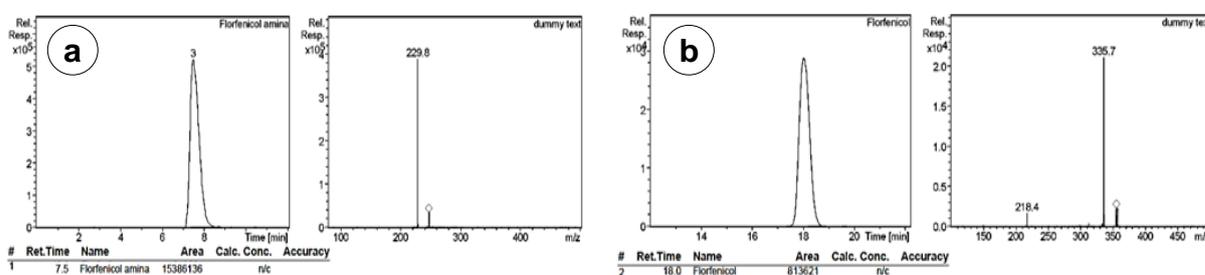
**Tabela 5.** Íons e fragmentos monitorados do florfenicol e do florfenicol amina.

<b>FLORFENICOL</b>	<b>Íon precursor</b>	<i>m/z</i> 355,8
	<b>Fragmento de quantificação</b>	<i>m/z</i> 335,6
	<b>Fragmento de confirmação</b>	<i>m/z</i> 218,4
<b>FLORFENICOL AMINA</b>	<b>Íon precursor</b>	<i>m/z</i> 247,9
	<b>Fragmento de quantificação</b>	<i>m/z</i> 229,9
	<b>Fragmento de confirmação</b>	<i>m/z</i> 129,9

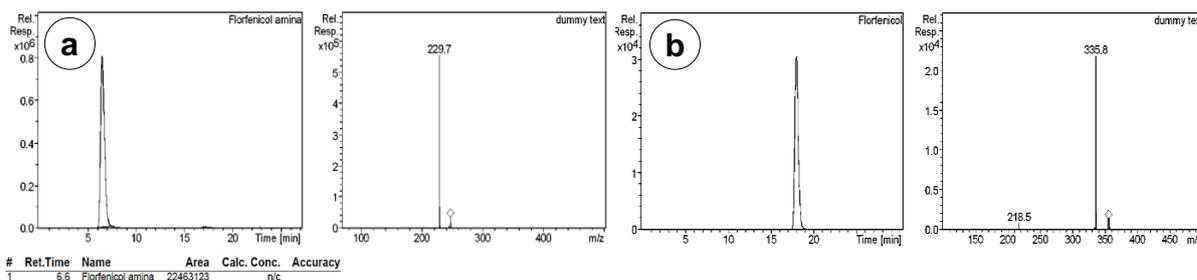
## 4.1.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

### 4.1.2.1. Colunas

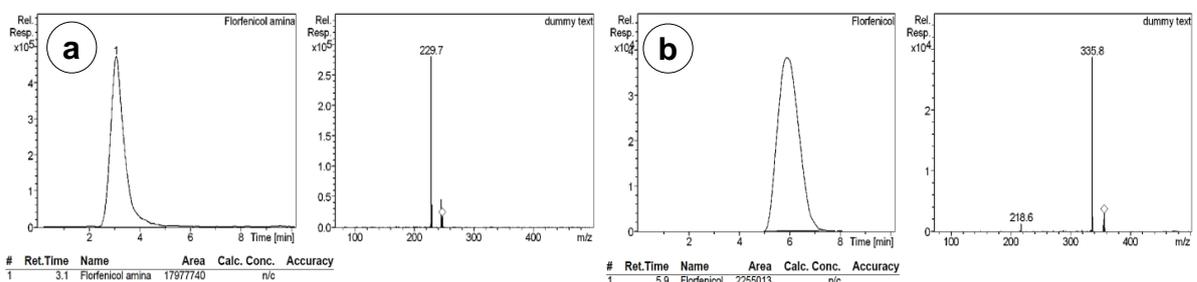
Após avaliar as três colunas nos modos isocrático e por gradiente, sendo: **1)** Coluna Lichrocart C<sub>8</sub> HPLC Cartridge Purospher Star, Merck **2)** Coluna XTerra RP<sub>18</sub>, Waters e **3)** Coluna Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> *narrow bore*, Agilent, verificou-se que os fármacos veterinários selecionados tiveram tempo de retenção maior nas colunas Lichrocart C<sub>8</sub> e coluna XTerra RP<sub>18</sub> (Figuras 18 e 19) do que na coluna Zorbax (Figura 20). A coluna Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> proporcionou uma separação mais rápida, já que essa coluna possui diâmetro interno menor (2,1 mm) quando comparado as outras duas colunas (4,6 mm). Visto que as três colunas poderiam ter sido utilizadas na separação do FF e do FFA, selecionou-se uma delas para prosseguir no desenvolvimento do método. A coluna Lichrocart C<sub>8</sub> foi a escolhida, pois a coluna XTerra RP<sub>18</sub> não estava tendo reprodutibilidade e a coluna Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> tinha um maior fator de assimetria. A coluna C<sub>8</sub> é também menor apolar que a C<sub>18</sub>, interagindo menos com o florfenicol, que ficou menos retido e diminuiu o tempo de retenção e de análise, quando se utilizou a eluição isocrática água: acetonitrila, ambas contendo 0,1% de ácido fórmico, 40:60 (v/v).



**Figura 18.** Cromatogramas obtidos utilizando a coluna Lichrocart C<sub>8</sub> HPLC Cartridge Purospher Star, Merck, 4,6 × 250 mm, d.p. 5 μm e fase móvel em eluição por gradiente, composto por 70% A e 30% B de 0,1 - 7,0 min, 0% A e 100% B de 7,1 - 15,0 min e 70% A e 30% B de 9,1 - 23,0 min; V<sub>inj</sub> = 25 μL; vazão = 500 μL min<sup>-1</sup>; T<sub>coluna</sub> = 40 °C; **(a)** florfenicol amina 1 μg mL<sup>-1</sup>; **(b)** florfenicol 1 μg mL<sup>-1</sup>.



**Figura 19.** Cromatogramas obtidos utilizando a coluna XTerra RP<sub>18</sub>, Waters 4,6 × 150 mm, d.p. 5 μm e fase móvel em eluição por gradiente, composto por 70% A e 30% B de 0,1 - 7,0 min, 0% A e 100% B de 7,1 - 9,0 min e 70% A e 30% B de 9,1 - 30,0 min; V<sub>inj</sub> = 25 μL; vazão = 500 μL min<sup>-1</sup>; T<sub>coluna</sub> = 40 °C; **(a)** florfenicol amina 1 μg mL<sup>-1</sup>; **(b)** florfenicol 1 μg mL<sup>-1</sup>.

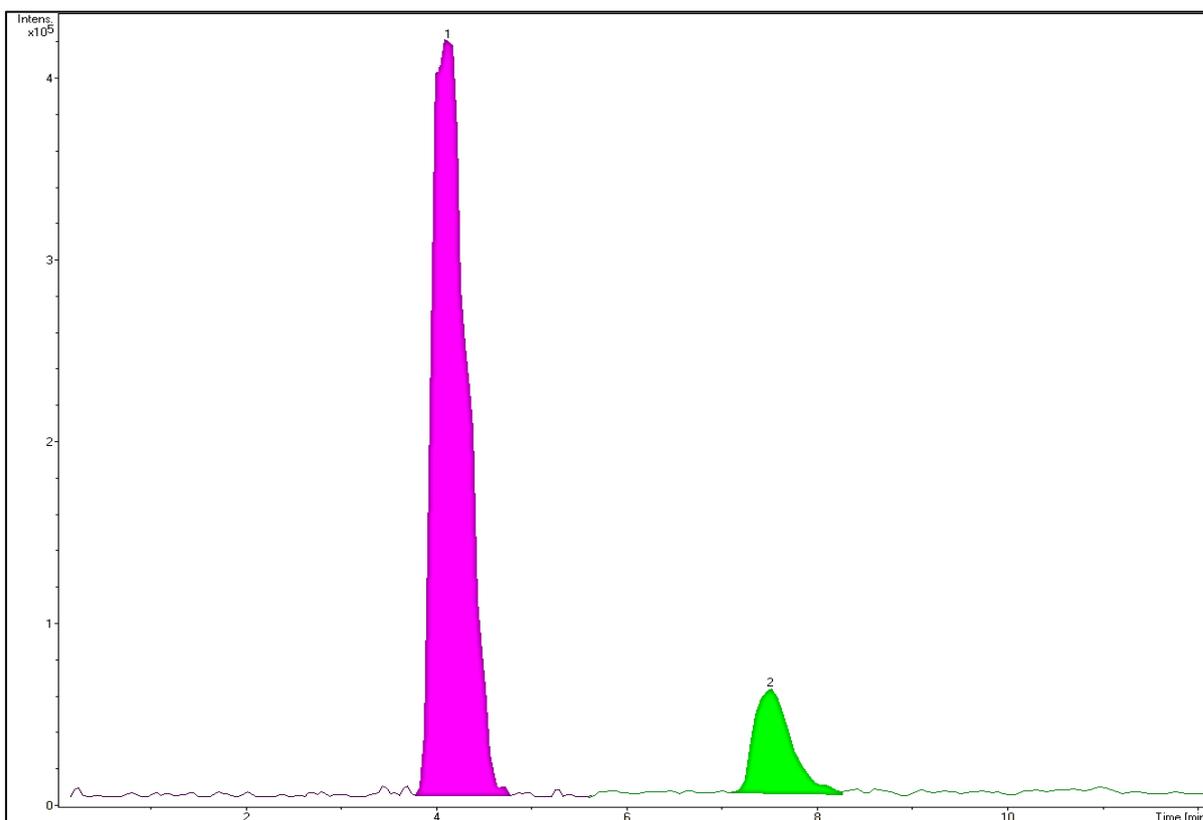


**Figura 20.** Cromatogramas obtidos utilizando a coluna Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> *narrow bore*, Agilent 2,1 × 150 mm, d.p. 5 μm e fase móvel em eluição por gradiente, composto por 70% A e 30% B de 0,1 - 7,0 min, 0% A e 100% B de 7,1 - 15,0 min e 70% A e 30% B de 9,1 - 23,0 min; V<sub>inj</sub> = 25 μL; vazão = 500 μL min<sup>-1</sup>; T<sub>coluna</sub> = 40 °C; **(a)** florfenicol amina 1 μg mL<sup>-1</sup>; **(b)** florfenicol 1 μg mL<sup>-1</sup>.

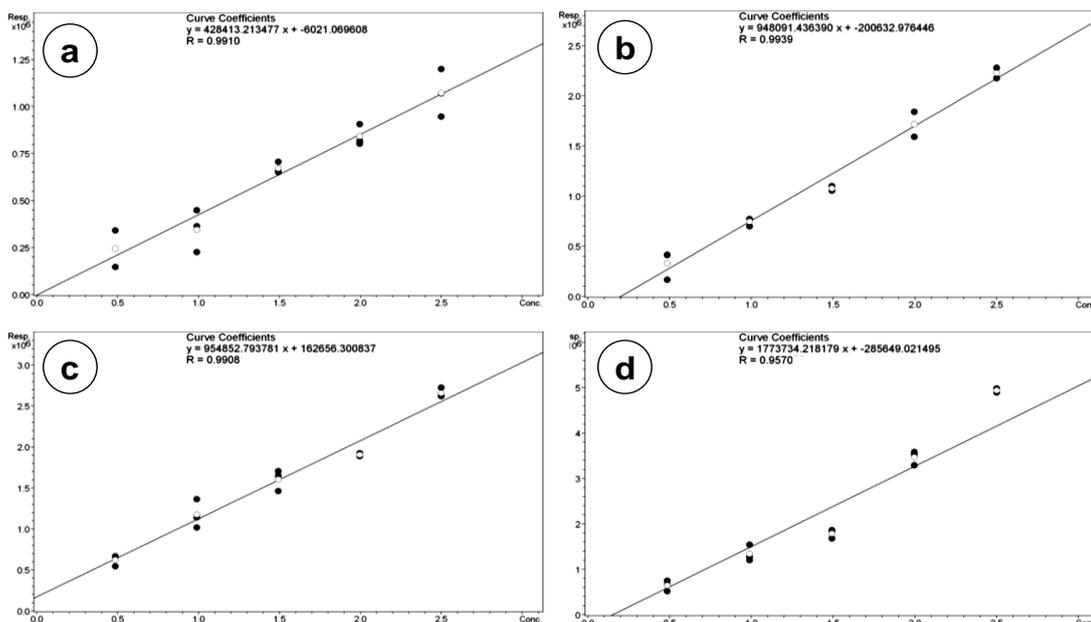
#### 4.1.2.2. Fase móvel e volume de injeção

Após selecionada a coluna, foram avaliadas as fases móveis compostas por água com 0,1% de ácido fórmico (v/v) (A): acetonitrila (B) ou ácido fórmico 0,1% (v/v) (A): metanol (C), nos modos isocrático e gradiente. Foi verificado que o solvente acetonitrila gerou melhores resultados, no modo de eluição isocrático 40:60 (v/v). A Figura 21 mostra a separação para o FF e FFA nessas condições. A eluição por gradiente gerou corridas mais longas e não foi utilizada, pois o método foi desenvolvido somente para dois compostos e não houve coeluição desses dois picos. Para dois compostos, a corrida no modo isocrático escolhido é considerada longa, pois necessitou de 12 minutos para a separação. Porém, esse tempo foi necessário para a estabilização, devido à mudança de polaridade do modo de ionização positivo para o negativo durante a mesma corrida.

Quanto aos outros parâmetros do HPLC, a temperatura da coluna otimizada foi de 40 °C, na qual os tempos de retenção não variaram quando comparados com a temperatura de 30 °C. Quanto aos volumes de injeção, não houve muita diferença entre os coeficientes de correlação para os volumes de 5 e 10 µL, conforme pode ser visto na Figura 22. Como não foi realizado o estudo para o florfenicol amina, optou-se por utilizar o volume de injeção de 10 µL. A vazão de fase móvel de 500 µL min<sup>-1</sup> forneceu separação mais rápida sem perda de resolução.



**Figura 21.** Cromatograma obtido utilizando a coluna Lichrocart C<sub>8</sub> HPLC Cartridge Purospher Star, Merck, 4,6 x 250 mm, d.p. 5 µm em eluição isocrática, água: acetonitrila, ambas contendo 0,1% de ácido fórmico, 40:60 (v/v); V<sub>inj</sub> = 10 µL; vazão = 500 µL min<sup>-1</sup>; T<sub>coluna</sub> = 40 °C; **(1)** florfenicol amina 1 µg mL<sup>-1</sup>; **(2)** florfenicol 1 µg mL<sup>-1</sup>.



**Figura 22.** Curvas analíticas do florfenicol ( $m/z$  335,8) na concentração  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  para avaliação do volume de injeção utilizando coluna *Lichrocart C<sub>8</sub> HPLC Cartridge Purospher Star*,  $4,6 \times 250$  mm, d.p.  $5 \mu\text{m}$  e fase móvel no modo de eluição isocrático 40:60 (v/v); vazão =  $500 \mu\text{L min}^{-1}$ ;  $T_{\text{coluna}} = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **(a)**  $V_{\text{inj}} = 5 \mu\text{L}$  ( $r = 0,9910$ ); **(b)**  $V_{\text{inj}} = 10 \mu\text{L}$  ( $r = 0,9939$ ); **(c)**  $V_{\text{inj}} = 15 \mu\text{L}$  ( $r = 0,9908$ ); **(d)**  $V_{\text{inj}} = 20 \mu\text{L}$  ( $r = 0,9570$ ).

Foram calculados parâmetros cromatográficos como resolução, fator de retenção, número de pratos, fator de assimetria e de separação (*Equações 10 a 15*) para verificar a conformidade do sistema cromatográfico na determinação de FF e FFA. Os resultados desses parâmetros estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Parâmetros cromatográficos obtidos na determinação do FF e FFA.

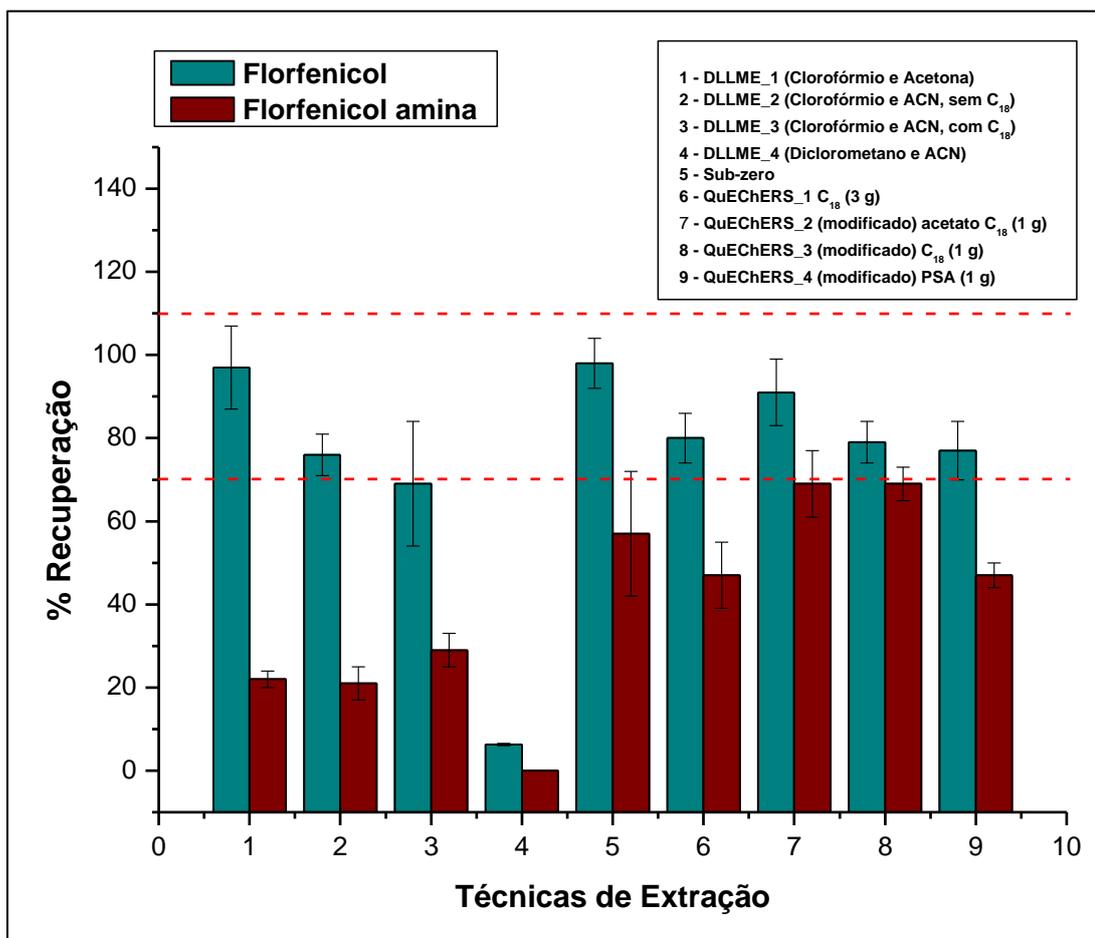
Parâmetro	FF	FFA
Fator de retenção (k)	7,4	4,0
Pratos por metro ( $N \text{ m}^{-1}$ )	3136	1024
Fator de assimetria	1,5	1,2
Resolução	2,8	
Fator de separação ( $\alpha$ )	1,9	

Quanto ao fator de retenção, k deve estar entre 1 a 10, sendo de 7,4 e 4,0, para o FF e FFA, respectivamente, demonstrando-se adequados. O fator de assimetria deve se encontrar no intervalo de 0,8 a 1,6, sendo de 1,5 e 1,2 para o FF e FFA, respectivamente, estando dentro do permitido. A resolução deve ser maior que 1,5, como foi o obtido, evidenciando conformidade do sistema cromatográfico na determinação dos compostos.

#### 4.2. PREPARO DA AMOSTRA

As 101 tilápias utilizadas como matriz branco para o desenvolvimento do método tinham peso médio de 48 g (estimativa do desvio padrão absoluto,  $s=14$  g) e comprimento médio de 14 cm ( $s=1$  cm).

As recuperações do florfenicol e do florfenicol amina calculadas para cada uma das nove técnicas de extração testadas estão apresentadas na Figura 23.



**Figura 23.** Valores de recuperação do florfenicol e florfenicol amina obtidos após diferentes extrações testadas na matriz de músculo de tilápia fortificado no LMR ( $n=3$ ).

Como um dos objetivos desse trabalho era utilizar uma técnica miniaturizada para a extração dos compostos da matriz músculo de tilápia, inicialmente, foi testada a técnica DLLME, pela simplicidade do método e por ter estudos na literatura para a extração do florfenicol com essa técnica. Porém, como não foram obtidas recuperações satisfatórias para o florfenicol amina por DLLME, conforme pode ser observado na Figura 23, foram realizadas modificações no método, assim como testes com a técnica sub-zero, o método QuEChERS, segundo a referência [40], e

suas modificações com a redução de massa de peixe, de sais, de solvente e de etapas de extração.

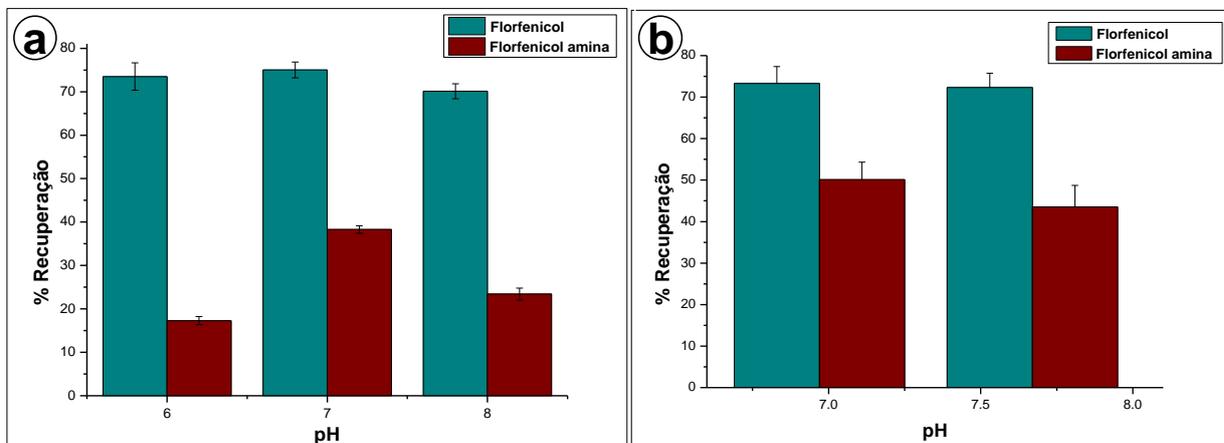
Verificou-se que as recuperações para o florfenicol por DLLME (exceto com diclorometano), sub-zero, QuEChERS e QuEChERS modificado foram satisfatórias, obtendo-se valores entre 70 a 110%, indicando bom desempenho do método desenvolvido para esses analitos.

Para a técnica DLLME utilizando o diclorometano como solvente extrator, a recuperação do florfenicol foi baixa em comparação com o DLLME utilizando o clorofórmio como solvente extrator. A recuperação do florfenicol utilizando diclorometano foi de 6,3% e não houve recuperação do florfenicol amina. Isso pode ter ocorrido porque o diclorometano tem densidade de  $1,33 \text{ g cm}^{-3}$  e ponto de ebulição de  $39,6 \text{ }^\circ\text{C}$ , enquanto que o clorofórmio tem densidade de  $1,49 \text{ g cm}^{-3}$  e ponto de ebulição de  $61,2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Com isso, supõe-se que houveram perdas do diclorometano por evaporação durante a extração. Percebeu-se também que utilizando o diclorometano houve uma pior separação de fases após a centrifugação.

O florfenicol tem  $\log K_{ow}$  0,37 e teve altas recuperações quando se utilizou solventes orgânicos como acetonitrila, acetona e clorofórmio. Porém, a recuperação para o florfenicol amina foi baixa, entre 22 e 29%, em qualquer dos métodos testados por DLLME. Foram realizadas modificações nos métodos de extração para melhorar essa recuperação, porém os resultados encontrados não foram promissores. Autores já reportaram na literatura a baixa recuperação do FFA, sendo de 38 a 50%, utilizando solvente orgânico como extrator, tanto por extração em fase sólida quanto líquida. [32, 38] O FFA possui  $\log K_{ow}$  de -1,18, sendo hidrofílico e apresentando baixa recuperação quando se utiliza somente solvente orgânico na extração. Como na técnica de DLLME se utiliza um sistema ternário de solventes, sendo um aquoso, um dispersor e um orgânico como extrator, não se prosseguiu com essa extração, pois o FFA é mais polar e não seria extraído para um solvente apolar.

Em relação ao pH, foram realizados testes por DLLME com a água deionizada em diferentes pH (6, 7 e 8) fortificada com florfenicol e florfenicol amina na concentração de  $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Também foram feitos testes por DLLME com fortificação da matriz branco com FF e FFA amina na concentração de  $1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ , com clorofórmio como solvente extrator e acetonitrila como solvente dispersor, utilizando a fase aquosa em pH 6,97 e 7,67. O resultado mais promissor de recuperação para

os dois compostos foi obtido em meio neutro (Figura 24). Esse resultado também foi obtido por [38] e explicado por Elimam *et al.* [75], que verificaram que há degradação do florfenicol em meio básico.



**Figura 24.** Valores de recuperação do florfenicol e florfenicol amina  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  obtidos por DLLME com clorofórmio como solvente extrator ( $n=3$ ) **(a)** em água; **(b)** em matriz branca de músculo de tilápia.

Para os métodos sub-zero e QuEChERS, as recuperações de FF e FFA foram mais satisfatórias quando comparadas ao DLLME. Entretanto, a técnica sub-zero teve a desvantagem de consumir mais tempo, uma vez que a amostra teve que ficar em congelamento por duas horas.

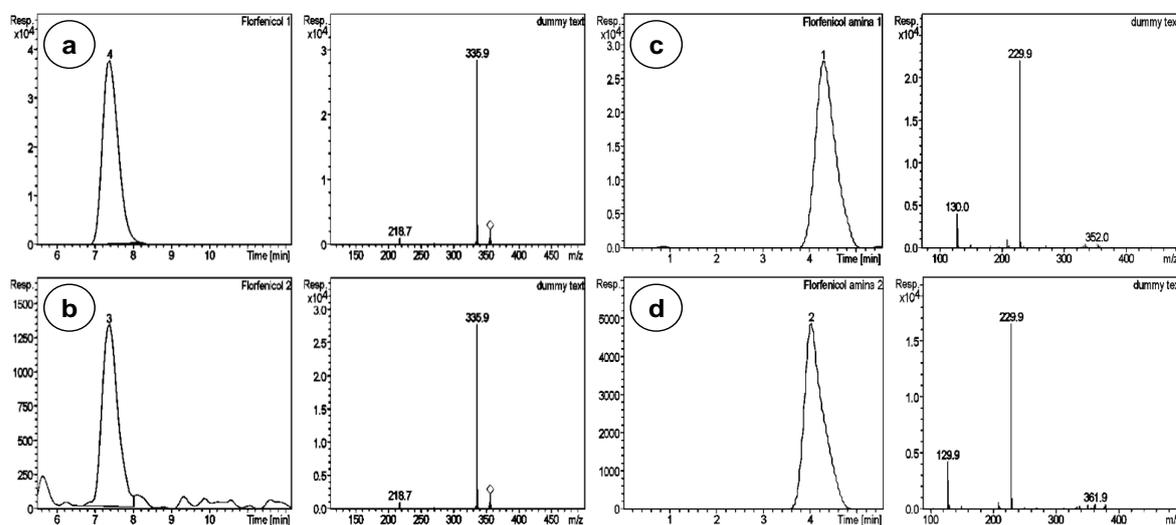
A melhor recuperação do FFA foi atingida quando se utilizou ACN com 1% ácido acético (HAc), que evitou perdas do metabólito por evaporação, como verificado por Zhang *et al.* [40] Como os  $pK_a$  são de 9,03 e 7,38 para o FF e o FFA, respectivamente, a extração foi realizada em pH neutro, sendo que para o FF, uma base, nesse pH estaria não ionizado e o FFA, estaria levemente ionizado, tendo preferência também pela fase aquosa e não pela orgânica.

Dos três métodos QuEChERS modificado testados, verificou-se que o  $C_{18}$  foi melhor para a remoção dos lipídeos na etapa de *clean-up* do que o PSA, pois gerou melhor recuperação tanto para o FF quanto para o FFA. Entre o QuEChERS modificado versão acetato e sem acetato, verificou-se que na versão acetato a recuperação para o FF foi um pouco mais alta e para o FFA foi a mesma. Porém, como acrescentaria mais etapas de pesagem de sal, de agitação e centrifugação, optou-se por utilizar o QuEChERS sem acetato por ser mais simples e gerar bons resultados de recuperação, ser de fácil execução, baixo custo e com uso reduzido de amostra, solvente e sais e com baixa geração de resíduos. Porém, como a

recuperação obtida para o FFA ficou abaixo de 70%, para a quantificação do FF e FFA na amostra real de músculo de tilápia tratada com o fármaco, a curva analítica foi construída fortificando o músculo (matriz branco) antes da extração (*matriz matched*), compensando as perdas pela extração nos cálculos.

O QuEChERS\_3 foi validado segundo os guias da comunidade europeia e do MAPA. Esse método consistia na extração de 1,00 g de peixe fortificado com os analitos na concentração de  $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$  com 5 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético (v/v), seguido de agitação por um minuto, da adição de 2,0 g de sulfato de magnésio e 50 mg de  $\text{C}_{18}$ , agitação por 1 min e centrifugação a  $3000 \times g$  por 5 minutos, com o sobrenadante seco em nitrogênio e ressuspenso em 500  $\mu\text{L}$  de fase móvel, filtrado a  $0,22 \mu\text{m}$  e injetado no sistema cromatográfico. Essa extração gerou altas recuperações para os dois analitos ao mesmo tempo e por ter um procedimento simples, com poucas etapas e com uso de menos reagentes, sais, solventes e amostras e menor geração de resíduos. [35, 75]

A Figura 25 apresenta os cromatogramas e os espectros de massas obtidos para a matriz de músculo de tilápia fortificado com  $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  e extraído por QuEChERS modificado (método 8).



**Figura 25.** Cromatogramas e espectros de massas para o florfenicol e florfenicol amina extraídos por QuEChERS modificado da matriz de músculo de tilápia fortificada com  $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  (a)  $m/z$  335,6 (fragmento de quantificação do florfenicol); (b)  $m/z$  218,4 (fragmento de identificação do florfenicol); (c)  $m/z$  229,9 (fragmento de quantificação do florfenicol amina); e (d)  $m/z$  129,9 (fragmento de identificação do florfenicol amina). Coluna *Lichrocart C<sub>8</sub> HPLC Cartridge Purospher Star*,  $4,6 \times 250 \text{ mm}$ , d.p.  $5 \mu\text{m}$  e fase móvel em eluição isocrática, água: acetonitrila, ambas com 0,1% de ácido fórmico, 40:60 (v/v);  $V_{inj} = 10 \mu\text{L}$ ; vazão =  $500 \mu\text{L min}^{-1}$ ;  $T_{coluna} = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

#### 4.3.1. ESTABILIDADE DOS PADRÕES

As condições ótimas para o armazenamento das soluções padrão foram frasco âmbar, no escuro, e mantida sob refrigeração a -20 °C por até 45 dias. [34] Quanto à estabilidade do padrão na matriz biológica, verificou-se que até o segundo descongelamento, após 15 dias, os analitos permaneceram estáveis na matriz. O critério de aceitabilidade do MAPA é de degradação de até 5%. [34] Após o terceiro ciclo de descongelamento ocorreu degradação, principalmente do FFA.

#### 4.3.2. EFEITO MATRIZ

A média para o efeito matriz para o florfenicol foi de -28% e para o florfenicol amina, -45%, obtidas pela Equação 7. Esse efeito matriz se encontra na faixa de 20 a 50%, sendo um efeito matriz médio. O efeito matriz foi negativo para ambos os analitos, indicando supressão do sinal no espectrômetro de massas devido a presença dos interferentes da matriz, que afetam o processo na fonte de eletronebulização.

Quanto à determinação do efeito matriz, os resultados obtidos comparando-se os três níveis de fortificação, pelos testes F e t de Student, estão apresentados na Tabela 7, com os valores de  $F_{crit}$ ,  $F_{calculado}$ ,  $t_{crit}$  e  $t_{calculado}$ .

**Tabela 7.** Valores de  $F_{crit}$ ,  $F_{calculado}$ ,  $t_{crit}$  e  $t_{calculado}$  para estudo do efeito matriz.

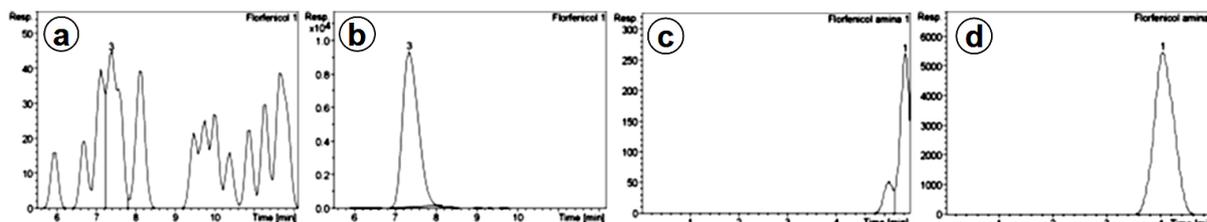
ANALITO	CONCENTRAÇÃO	$F_{calculado}$	$F_{crit,0.05,5,5}$	$t_{calculado}$	$t_{crit,0.05,10}$
FLORFENICOL	0,50 LMR	0,90	0,20	11,29	2,23
	1,00 LMR	1,47	0,20	9,38	2,23
	1,50 LMR	0,53	0,20	11,46	2,23
FLORFENICOL AMINA	0,50 LMR	1,52	0,20	7,59	2,23
	1,00 LMR	1,60	0,20	8,86	2,23
	1,50 LMR	2,15	0,20	16,47	2,23

LMR = 1,0  $\mu\text{g g}^{-1}$

Em todas as concentrações, tanto para o FF quanto para o FFA, os valores de  $F_{calc,i} > F_{crit,\alpha,\nu_1,\nu_2}$ , ou seja, as variâncias não podem ser consideradas estatisticamente iguais no nível de fortificação  $i$  considerado. Foi realizado então o teste t, em que todos os valores de  $t_{calc,i} > t_{crit,\alpha,n}$ . Portanto, a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado. [35] Com isso, a quantificação de florfenicol e florfenicol amina deve ser realizada na curva matrizada.

### 4.3.3. SELETIVIDADE

A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas da matriz branco com a matriz branco fortificada em 0,25 LMR, submetidos ao mesmo preparo de amostra (Figura 26).



**Figura 26.** Cromatogramas do extrato da matriz de músculo de tilápia **(a)** sem fortificação (região de  $t_R$  do FF); **(b)** fortificado com florfenicol 0,25 LMR; **(c)** sem fortificação (região de  $t_R$  do FFA); **(d)** fortificado com florfenicol amina 0,25 LMR.

O método se mostrou seletivo pela ausência de picos no mesmo tempo de retenção do analito em estudo ou com picos de baixa intensidade. O MAPA descreve como critério de aceitabilidade de seletividade, que o sinal do interferente seja igual ou inferior a 30% do sinal do analito no menor nível de concentração da curva matrizada. [35]

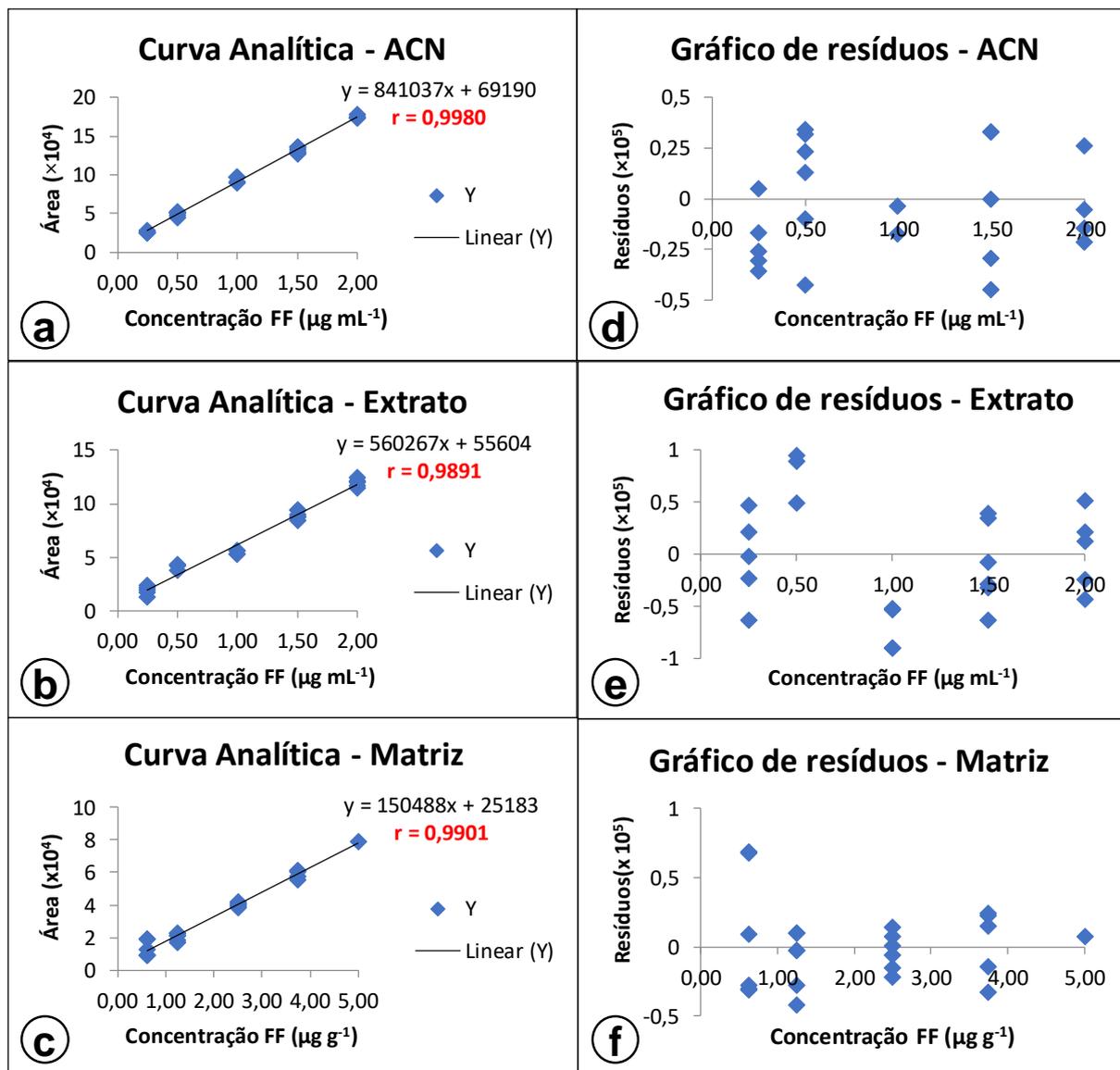
### 4.3.4. FAIXA LINEAR E LINEARIDADE

A linearidade foi avaliada pela regressão linear calculada pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), sendo utilizado o programa Excel®.

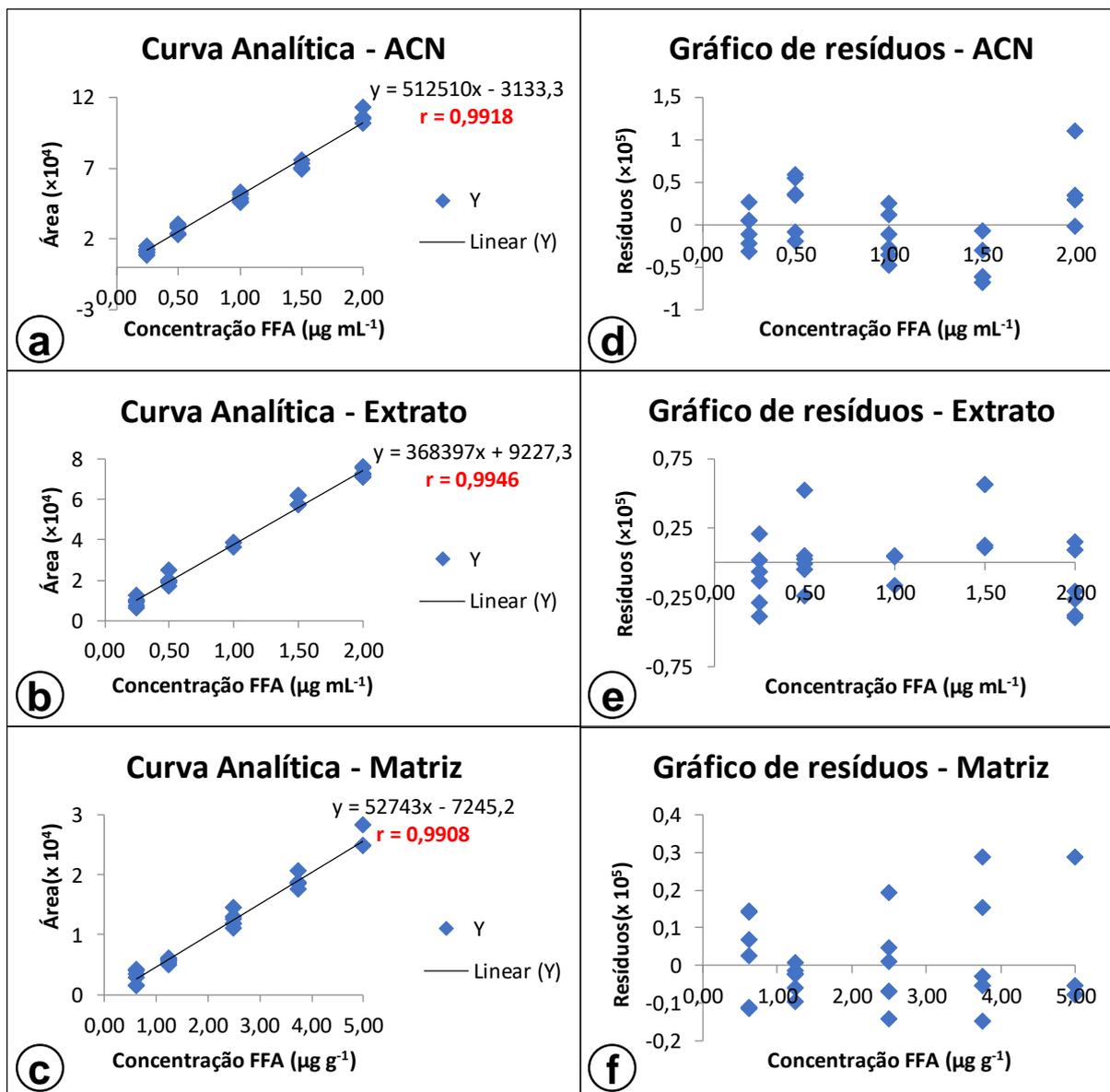
Foram obtidas a curva analítica, o gráfico de resíduos, a equação da reta e os parâmetros de regressão linear, como coeficientes a, b e r (coeficiente de correlação linear), que são parâmetros para estimar a qualidade da curva analítica. De acordo com a comunidade europeia, r maiores que 0,99 indicam linearidade adequada. As curvas analíticas construídas mostraram-se lineares no intervalo de trabalho estudado (0,25 - 2,0 LMR), apresentando r superiores ou próximos de 0,99, como recomendado pela Comunidade Europeia e o MAPA. [34, 35]

As curvas analíticas e os gráficos de resíduos construídos no solvente e no extrato da matriz branco fortificadas com o florfenicol e o florfenicol amina nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e na matriz branco, as fortificações com florfenicol e o florfenicol amina foram nas concentrações de 0,63; 1,25; 2,50; 3,75 e 5,00  $\mu\text{g g}^{-1}$ , encontram-se nas Figuras 27 e 28.

O gráfico de resíduos foi construído para avaliar a presença de *outliers*. Os pontos estão distribuídos aleatoriamente em torno do zero, sem nenhuma tendência, indicando que a variância dos resíduos é homoscedástica.



**Figura 27.** Curvas analíticas do florfenicol nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em (a) fase móvel (A) água: (B) ACN, ambos com 0,1% de ácido fórmico, 40:60 (v/v) e (b) extrato da matriz de músculo de tilápia; (c) e 0,63; 1,25; 2,50; 3,75 e 5,00  $\mu\text{g g}^{-1}$  na matriz de músculo de tilápia; Gráfico de resíduos da curva (d) no solvente; (e) no extrato de músculo de tilápia; (f) e na matriz de músculo de tilápia. Coluna Lichrocart C<sub>8</sub> HPLC Cartridge Purospher Star, 4,6  $\times$  250 mm, d.p. 5  $\mu\text{m}$  e fase móvel em eluição isocrática, água: acetonitrila, ambos com 0,1% de ácido fórmico, 40:60 (v/v);  $V_{inj}$  = 10  $\mu\text{L}$ ; vazão = 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ ;  $T_{coluna}$  = 40  $^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 28.** Curvas analíticas do florfenicol amina nas concentrações: de 0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em (a) fase móvel (A) água: (B) ACN, ambos com 0,1% de ácido fórmico, 40:60 (v/v) e (b) extrato da matriz de músculo de tilápia; (c) e 0,63; 1,25; 2,50; 3,75 e 5,00  $\mu\text{g g}^{-1}$  na matriz de músculo de tilápia; Gráfico de resíduos da curva (d) no solvente; (e) no extrato de músculo de tilápia; (f) na matriz de músculo de tilápia. Coluna Lichrocart C<sub>8</sub> HPLC Cartridge Purospher Star, 4,6  $\times$  250 mm, d.p. 5  $\mu\text{m}$  e fase móvel em eluição isocrática, água: acetonitrila, ambos com 0,1% de ácido fórmico, 40:60 (v/v);  $V_{inj} = 10 \mu\text{L}$ ; vazão = 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ ;  $T_{coluna} = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.3.5. EXATIDÃO E PRECISÃO

As curvas analíticas e os coeficientes de correlação linear ( $r$ ) no extrato e na matriz branco fortificada com florfenicol e florfenicol amina nos três dias estão apresentadas na Tabela 8.

**Tabela 8.** Curvas analíticas no extrato e na matriz branco fortificada com florfenicol e florfenicol amina em três dias e coeficientes linear, angular e de correlação linear (r).

Analito	Dia	Curva Analítica			
		Extrato	r	Matriz	r
FLORFENICOL	1	761880x + 43504	0,9912	235305 x - 36323	0,9959
	2	560267x + 55604	0,9891	150488 x + 25183	0,9901
	3	352471x + 89386	0,9938	110830x + 43306	0,9951
FLORFENICOL AMINA	1	773411x - 125531	0,9909	123272x -10361	0,9937
	2	4164245x + 40711	0,9858	52743x + 25183	0,9908
	3	368397x + 9227	0,9946	55679x - 10885	0,9901

A exatidão, a precisão intradia (repetibilidade) e interdia do método foram obtidas em sextuplicata nos três níveis de fortificação 0,5, 1,0 e 1,5 LMR, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ . As recuperações para os dois analitos situaram-se na faixa de 62-79%. Para o florfenicol, as recuperações ficaram dentro do intervalo determinado pela comunidade europeia de 70% a 110%, para a concentração trabalhada [34]. Mas para o florfenicol amina, as recuperações ficaram abaixo de 70%. Porém, mesmo a recuperação do FFA sendo abaixo de 70%, esse valor obtido é superior aos encontrados na literatura, que foram de 38 a 50%. [32, 38]

Portanto, para a quantificação do FF e do FFA em amostras reais, as curvas analíticas devem ser construídas na matriz, com fortificação antes da extração.

Precisões intradia (n=6) e a interdia (n=18) foram expressas como coeficiente de variação (CV, em %), sendo todos menores que 20%. [35]

Os resultados de recuperação e precisão estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Exatidão e de precisão intradia e interdia para o florfenicol e o florfenicol amina.

Analito	CONCENTRAÇÃO	RECUPERAÇÃO (%)	PRECISÃO (CV, em %)	
			INTRADIA (n=6)	INTER-DIAS (n=18)
FLORFENICOL	0,50 LMR	(70 ± 7)	4	11
	1,00 LMR	(79 ± 5)	4	12
	1,50 LMR	(75 ± 3)	6	7
FLORFENICOL AMINA	0,50 LMR	(62 ± 14)	7	5
	1,00 LMR	(69 ± 4)	10	16
	1,50 LMR	(66 ± 5)	9	18

LMR = 1,0  $\mu\text{g g}^{-1}$

#### 4.3.6. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO E DE DETECÇÃO

Para o florfenicol, o LQ do instrumento foi de  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ , com  $\text{CV} = 8 \%$  e recuperação de  $92\%$  e para o florfenicol amina, o LQ do instrumento foi de  $0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , com  $\text{CV} = 10\%$  e recuperação de  $76\%$ . O LD do instrumento, calculado de acordo com a *Equação 2*, foi de  $0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o florfenicol e de  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o florfenicol amina.

O LQ do método foi de  $0,125 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $0,25 \mu\text{g g}^{-1}$ , para o florfenicol e o florfenicol amina, respectivamente. O LD do método foi de  $0,0625 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $0,125 \mu\text{g g}^{-1}$ , para o florfenicol e o florfenicol amina, respectivamente.

Esses valores de LQ indicam que esse método pode quantificar o florfenicol em valores vinte vezes abaixo do LMR, porém, comparando com os valores de LD e LQ encontrados na literatura (Tabela 2, página 16), os obtidos neste trabalho foram mais altos. Isso pode ter sido ocorrido devido à utilização de detectores mais sensíveis nos trabalhos encontrados na literatura.

#### 4.3.7. LIMITE DE DECISÃO E CAPACIDADE DE DETECÇÃO

Para o florfenicol, o  $\text{CC}_\alpha$  calculado foi de  $1183 \mu\text{g kg}^{-1}$  e o  $\text{CC}_\beta$ ,  $1365 \mu\text{g kg}^{-1}$ , obtidos utilizando-se a curva analítica fortificada na matriz. Os valores encontrados foram próximos ao LMR, como preconizado pelo MAPA. [35] O florfenicol amina é um metabólito e não possui LMR, então não foram calculados esses parâmetros. A Figura 29 mostra a interpretação dos resultados de  $\text{CC}_\alpha$  e  $\text{CC}_\beta$ .

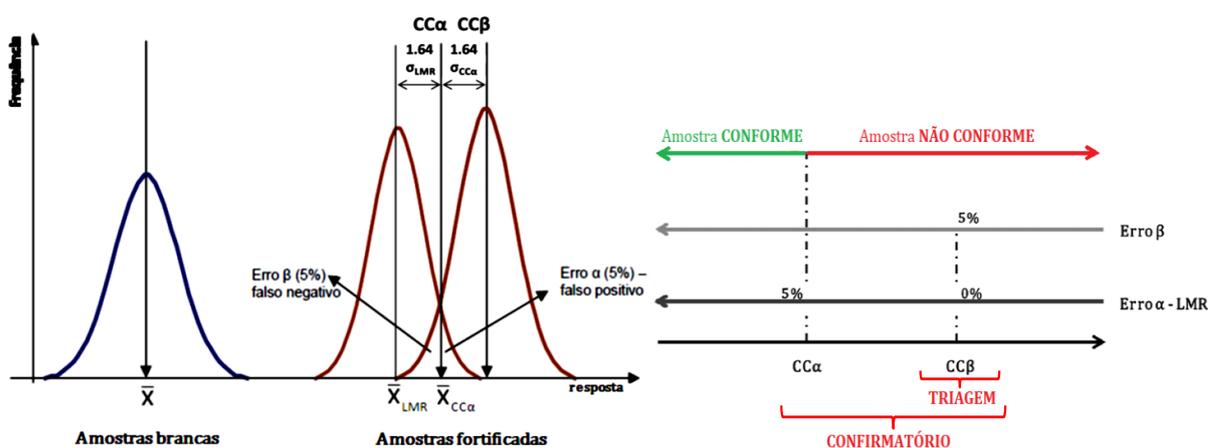


Figura 29. Interpretação dos resultados do  $\text{CC}_\alpha$  e  $\text{CC}_\beta$ .

Comparando os valores de  $CC_{\alpha}$  e  $CC_{\beta}$  encontrados com os da literatura, (Tabela 2, página 16), verificou-se que esses parâmetros diferiram bastante entre os trabalhos. Isso pode ser explicado devido à variação do LMR dos compostos, de acordo com o país em que se foi realizado o estudo, pois os alimentos podem ser consumidos em maior ou menor quantidade por uma população devido a questões climáticas, étnicas, culturais. O LMR influencia nos valores de  $CC_{\alpha}$  e do  $CC_{\beta}$ , pois é utilizado na equação (Equações 14 e 15) para o cálculo desses parâmetros.

#### **4.4. ENSAIOS DE BIOCONCENTRAÇÃO**

Por meio deste estudo foi possível detectar os resíduos das moléculas de florfenicol em função do tempo de exposição dos peixes na água contendo o antibiótico, para o cálculo do fator de bioconcentração. Estas medidas foram relevantes para confrontar os dados de acúmulo com a IDA, calcular parâmetros cinéticos e o período de depleção desses resíduos das tilápias.

##### **4.4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

As 160 tilápias utilizadas no ensaio de bioconcentração tinham peso médio de  $(37 \pm 5)$  g e comprimento médio de  $(13,1 \pm 0,6)$  cm).

##### **4.4.2. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS**

O sistema utilizado para a criação das tilápias foi semiestático, com aeração constante, temperatura de  $(26 \pm 1)$  °C e fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro. O pH foi de  $(7,2 \pm 0,2)$ , o oxigênio dissolvido,  $(8,1 \pm 0,5)$  mg L<sup>-1</sup>, a condutividade,  $(0,09 \pm 0,01)$  μS cm<sup>-1</sup>, a dureza de 50 μg g<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> (3 °dH) e amônia de 0,31 μg mL<sup>-1</sup>. As condições experimentais foram ótimas para a criação das tilápias.

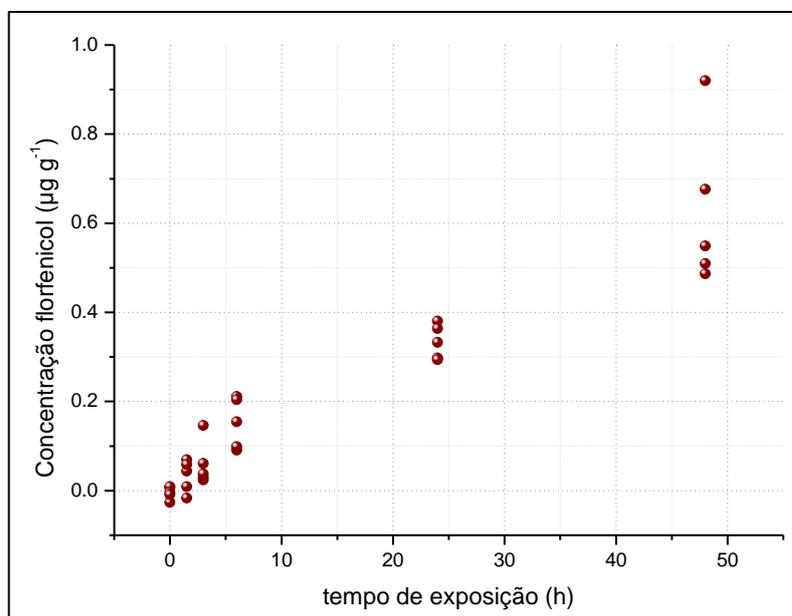
##### **4.4.3. CÁLCULO DO FATOR DE BIOCONCENTRAÇÃO**

A concentração de florfenicol pela via de administração na água foi de 10 mg L<sup>-1</sup>. Essa concentração de florfenicol também já foi utilizada por [76], para verificar a sobrevivência pós transporte de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), com peso médio de  $(30 \pm 2)$  g, que foram posteriormente estocados em tanques-rede. O transporte desses peixes foi realizado em embalagens plásticas de 30 L, contendo 40 peixes cada, sendo que a água utilizada no transporte continha os seguintes

aditivos: 8 g L<sup>-1</sup> de sal, 10 mg L<sup>-1</sup> de florfenicol, 1 mg L<sup>-1</sup> de oxitetraciclina.

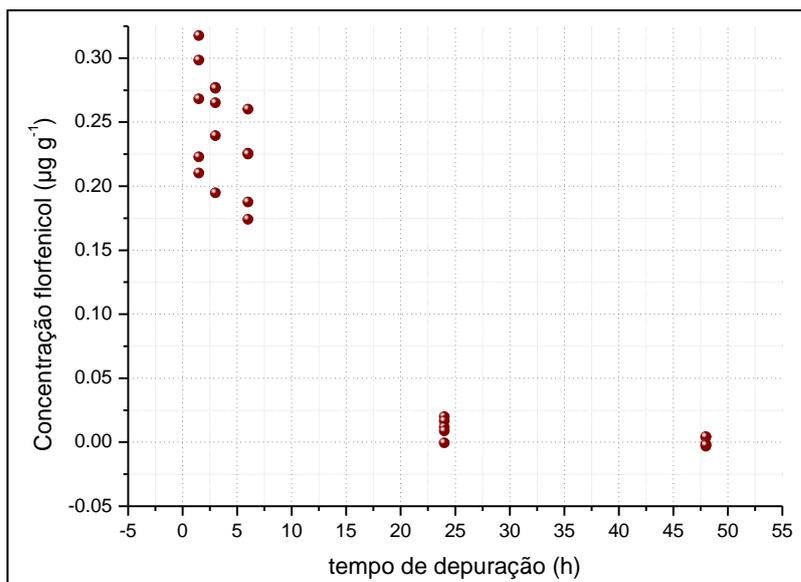
Nesse trabalho, foi verificado se essa concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> de florfenicol em água, adicionada tanto para a prevenção, tratamento de infecções ou para o transporte de peixes, geraria uma bioconcentração do antibiótico no músculo das tilápias e se esse composto seria rapidamente eliminado, estando de acordo com o limite máximo de resíduo permitido pela literatura.

Após a análise dos resíduos do músculo das tilápias por LC-MS/MS, com o método desenvolvido e validado neste trabalho, foi construído o gráfico da Figura 30, que relaciona a concentração obtida no músculo da tilápia (n=5) em função do tempo de coleta na exposição (0, 1,5; 3; 6; 24 e 48 horas).



**Figura 30.** Gráfico da concentração do florfenicol no músculo de tilápia nos tempos de 0; 1,5; 3; 6; 24 e 48 h de exposição ao antibiótico florfenicol 10 µg mL<sup>-1</sup> (n=5 peixes).

O gráfico da Figura 31 relaciona a concentração obtida no músculo da tilápia, em quintuplicata, em função do tempo de coleta na depuração (1,5; 3; 6; 24, 48 e 120 horas).



**Figura 31.** Gráfico da concentração do florfenicol no músculo de tilápia nos tempos de 1,5; 3; 6; 24; 48 e 120 h de depuração do antibiótico florfenicol (n=5 peixes).

Para o cálculo do fator de bioconcentração, foi utilizada a relação que descreve a absorção e a eliminação, descrita na *Equação 16* [77]:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f \quad (\text{Equação 16})$$

em que:  $C_f$  = concentração do composto no músculo do peixe

$C_w$  = concentração do composto na água

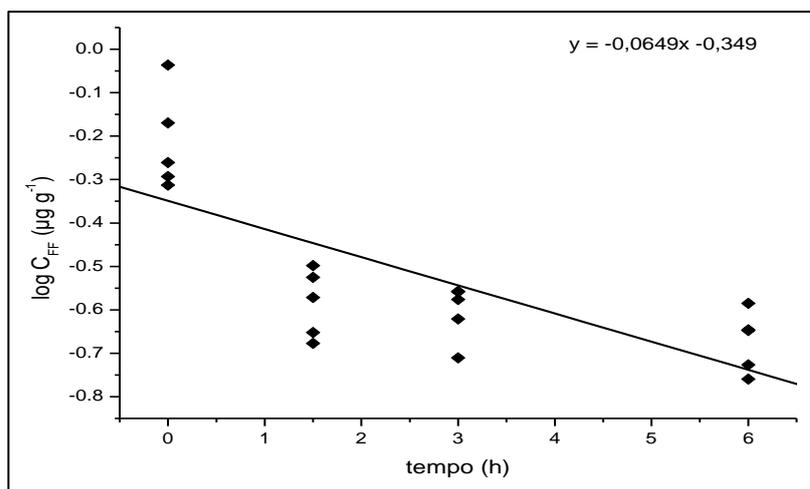
$k_1$  = Constante de absorção

$k_2$  = Constante de eliminação

Quando o equilíbrio aparente durante a fase de acúmulo do antibiótico é atingido,  $dC_f/dt = 0$ ,  $k_1 C_w = k_2 C_f$ , o fator de bioconcentração ( $FBC$ ) é calculado de acordo com a *Equação 1*, que é a relação entre a concentração do antibiótico no músculo do peixe ( $C_f$ ) e a concentração do florfenicol na água ( $C_w$ ), quando foi atingido o estado de equilíbrio. [17] Porém, quando o estudo é rápido e não se atinge o estado de equilíbrio, o fator de bioconcentração pode ser calculado de acordo com a *Equação 17*, que expressa a relação entre as constantes de velocidade de absorção e de eliminação:

$$FBC = \frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} \quad (\text{Equação 17})$$

Primeiramente, se calculou a constante de eliminação  $k_2$ , dada pela inclinação da reta log da concentração do florfenicol ( $\log C_{FF}$ ) na depuração pelo tempo (Figura 32). Foram excluídas as concentrações referentes aos tempos de 24 e 48 h de depuração, por estarem abaixo do limite de quantificação do método, que foi de  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Figura 32.** Valores de log da concentração de florfenicol em músculo de tilápia na fase de depuração ao fármaco em relação ao tempo (n=5 peixes).

Como o gráfico foi construído em log, há um fator de multiplicação por 2,303 (Equação 18), para calcular a constante de eliminação  $k_2$ .

$$k_2 = \text{inclinação} \times 2,303 \quad (\text{Equação 18})$$

$$k_2 = -0,0649 \times 2,303 = -0,149 \text{ h}^{-1}$$

Com essa constante, pode ser calculado também o tempo de meia-vida do florfenicol ( $t_{1/2b}$ ), que é o tempo em que há redução na concentração do composto em 50% do valor inicial, calculado de acordo com a Equação 19 [77]:

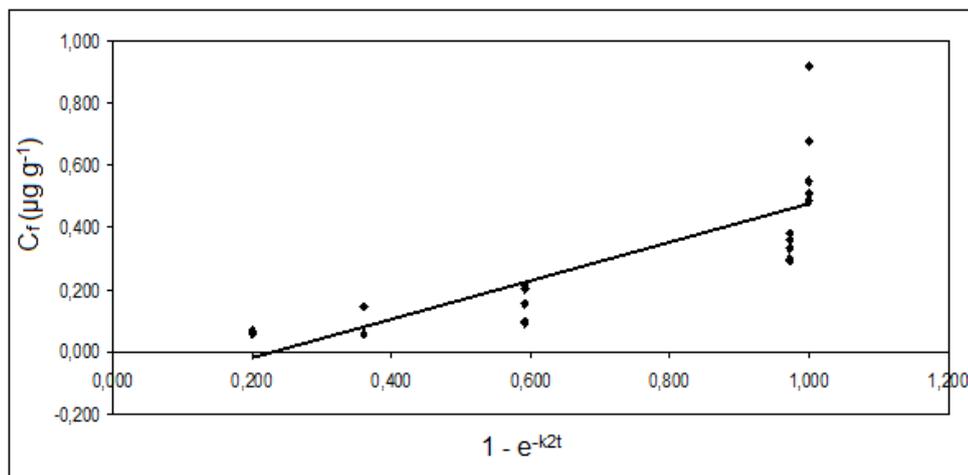
$$t_{1/2b} = \frac{0,693}{|k_2|} \quad (\text{Equação 19})$$

O tempo de meia vida obtido foi de 4,65 h.

Quando  $C_w$  é constante, a Equação 16 pode ser integrada, resultando na Equação 20 [17, 77]:

$$C_f = \left( \frac{k_1}{k_2} \times C_w \right) (1 - e^{-k_2 t}) \quad (\text{Equação 20})$$

Construiu-se o gráfico da Figura 33 para calcular a constante  $k_1$ . Esse gráfico relaciona a concentração do florfenicol no músculo da tilápia ( $C_f$ ) nos tempos ( $t$ ) de 1,5; 3; 6; 24 e 48 h de exposição em função de  $1 - e^{-k_2 t}$ . A inclinação dessa reta é  $\frac{k_1}{k_2} \times C_w$ . Sendo  $k_2$  e  $C_w$  conhecidos, é possível encontrar o valor de  $k_1$ .



**Figura 33.** Relação entre os valores de concentração de florfenicol em músculo de *O. niloticus* na fase de exposição ao fármaco e valores de  $1 - e^{-k_2 t}$  nos diferentes períodos ( $t$ ) desta fase.

O  $k_1$  é dado pela Equação 21:

$$k_1 = \frac{\text{inclinação} \times k_2}{C_w} \quad (\text{Equação 21})$$

Em que:  $C_w$  = Média da concentração do florfenicol na água a partir do tempo de 1,5 h de exposição =  $11,72 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $s = 1,06$ ).

$$k_1 = \frac{0,614 \times (-0,149)}{11,72} = -0,0078 \text{ h}^{-1}$$

O fator de bioconcentração foi calculado dividindo-se o  $k_1$  pelo  $k_2$  (Equação 9):

$$FBC = \frac{k_1}{k_2} = \frac{-0,0078}{-0,149} = 0,052$$

Como descrito na Equação 1, o fator de bioconcentração pode ser calculado também pela relação entre a concentração do antibiótico no músculo do peixe ( $C_f$ ) e a concentração do florfenicol na água ( $C_w$ ), quando foi atingido o equilíbrio aparente durante a fase de acúmulo do antibiótico. Considerando-se que no tempo máximo de exposição (48 h) se atingiu o equilíbrio, pode ser utilizada a média da concentração do florfenicol em músculo de *O. niloticus* nesse tempo, que foi de  $0,62 \mu\text{g g}^{-1}$ :

$$FBC = \frac{C_f}{C_w} = \frac{0,62}{11,72} = 0,053$$

Verificou-se que o valor de FBC calculado pelas constantes  $k_1$  e  $k_2$  foram concordantes com o calculado pelas concentrações  $C_f$  e  $C_w$ .

Ellgehausen *et al.* [78] propuseram uma equação de regressão linear que relaciona o fator de bioconcentração ao  $K_{ow}$  de um determinado composto. Para isso, estudaram a bioconcentração de dez pesticidas com diferentes polaridades em *catfish* (*Ictalurus melas*), obtendo a Equação 22.

$$\log FBC = 0,83 \times \log K_{ow} - 1,71 \quad (\text{Equação 22})$$

Visto que o valor do  $\log K_{ow}$  do florfenicol é 0,37, obtém-se um FBC de 0,040.

$$\log FBC = 0,83 \times 0,37 - 1,71 = -1,40$$

$$FBC = 0,040$$

O FBC de 0,053 para o florfenicol obtido experimentalmente para a tilápia está bem próximo ao valor teórico de 0,040 calculado pela Equação 22, obtido para *catfish* [78]. O FBC para um mesmo composto pode variar com a espécie utilizada no estudo, pois cada peixe possui uma porcentagem de gordura. Quanto maior a porcentagem de gordura, maior o potencial de acúmulo de compostos apolares e maior o FBC e a bioconcentração.

Todos os parâmetros cinéticos calculados para florfenicol em músculo de tilápia expostas à concentração de 11,72  $\mu\text{g mL}^{-1}$  durante 48 h, seguida da depuração, estão resumidas na Tabela 10. Os valores entre parêntesis são referentes ao erro padrão, calculado pelo *software Statgraphics*.

**Tabela 10.** Parâmetros cinéticos calculados para florfenicol em músculo de *O. niloticus* exposto à concentração nominal de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  durante 48 h

$k_1$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$k_2$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$t_{1/2b}$ (h)	$C_f^a$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$C_w$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	FBC ( $\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$ )	L.S. 95% FBC <sup>b</sup> ( $\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$ )
0,008 (0,004)	-0,15 (0,03)	5 (1)	0,6 (0,3)	12 (1)	0,05 (0,04)	0,183

<sup>a</sup> Concentração estimada do florfenicol em músculo de *O. niloticus* no estado de equilíbrio

<sup>b</sup> Limite superior (L.S.) do intervalo de confiança (95% de certeza) do FBC

O valor máximo de concentração de florfenicol encontrado no filé de tilápia foi de 0,92  $\mu\text{g g}^{-1}$ , referente a 48h de exposição ao antibiótico, na dosagem de 10  $\text{mg L}^{-1}$ . Segundo o FDA (*Food and Drug Administration*), a ingestão diária aceitável do florfenicol é de 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo por dia. [79] Uma pessoa de 70 kg

poderia consumir no máximo 700 µg de florfenicol por dia. Se a tilápia estiver com 0,92 µg de florfenicol a cada 1 g de peixe, a massa de peixe que essa pessoa poderia consumir por dia seria de no máximo 761 g, para não ter efeito adverso e estar dentro do limite de segurança estabelecido pela legislação. Segundo a FAO, 2018, o consumo médio de peixe é de 20 kg ao ano, ou seja, aproximadamente 55 g ao dia. Com esse valor, seria ingerido, no pior caso, 50,6 µg de florfenicol, que seria 14 vezes inferior à IDA estabelecida. Considerando-se o limite superior de FBC de 0,183 mL µg<sup>-1</sup>, para uma concentração de 10 µg mL<sup>-1</sup> de florfenicol em água, a concentração de fármaco no músculo seria de 1,83 µg g<sup>-1</sup>. Uma pessoa de 70 kg poderia ingerir 383 g desse peixe. Como a ingestão média de peixe é de 55 g, a quantidade de florfenicol nessa situação estaria 7 vezes inferior à permitida de acordo com a IDA.

Quanto aos valores de florfenicol encontrados em amostras de água do meio ambiente, Wei *et al.* [80] encontraram florfenicol em concentrações de 0,95, 2,40 e 2,84 µg L<sup>-1</sup> em amostras de efluente de fazenda de criação de animais, rios e lagoas, respectivamente, de regiões chinesas. Zong *et al.* detectaram florfenicol na faixa de 29,8 µg L<sup>-1</sup> a 11 mg L<sup>-1</sup> em amostras de água de regiões costeiras da China, próximas a pisciculturas. [81] Considerando-se o fator de bioconcentração do florfenicol calculado nesse trabalho, 0,053 mL µg<sup>-1</sup>, para a concentração de 0,0298 µg mL<sup>-1</sup> de florfenicol na água, o acúmulo no peixe seria de 1,58×10<sup>-3</sup> µg g<sup>-1</sup> de florfenicol. Para a concentração de 11 µg mL<sup>-1</sup> do fármaco em água, o acúmulo seria de 0,58 µg g<sup>-1</sup> de florfenicol. Uma pessoa de 70 kg poderia ingerir até 1200 g desse peixe e ainda estaria de acordo com a IDA estabelecida pela legislação. Portanto, mesmo no pior caso, com a máxima concentração de florfenicol obtida na água no ambiente [81], a ingestão de peixe estaria segura, devido ao baixo potencial de acúmulo do florfenicol em peixes, através da água.

Comparando-se o valor do fator de bioconcentração encontrado para o florfenicol em tilápias, de 0,053 mL µg<sup>-1</sup>, com os FBC obtidos por ensaio de bioconcentração com 250 µg L<sup>-1</sup> de ibuprofeno (log K<sub>ow</sub> de 3,97) em água para os peixes boi de cabeça chata e bagre americano, que foram de 0,69 e 0,08 mL µg<sup>-1</sup>, respectivamente, verifica-se que os valores encontrados para o FF estão na mesma ordem de grandeza. [21] O resultado do BCF de 0,053, indica que o potencial de acúmulo do florfenicol em tilápias é mínimo. Schwaiger *et al.* [82] verificaram que o FBC de 1 µg L<sup>-1</sup> de diclofenaco por 28 dias em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)

foi de 69-2732, porém o diclofenaco é mais lipofílico ( $\log K_{ow} = 4,02$ ) e pode ter um maior potencial para acumular nos tecidos. Xie *et al.* [83] estudaram a bioconcentração de tetraciclina em larvas de *Chironomus riparius*. O FBC encontrado foi de 0,74 quando a concentração do antibiótico foi de  $18,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , indicando que o potencial de bioconcentração da tetraciclina nessa espécie não foi alta.

Zhang *et al.* [22] calcularam um valor de FBC de 0,5 para florfenicol em ova de caranguejo. Neste trabalho, concluíram que antibióticos que possuem FBC superiores a 1000 são potencialmente bioacumulativos, como a sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfapiridina, trimetoprima, ofloxacina, enrofluxacina e azitromicina. [22] Portanto, quando há presença desses compostos em meio aquático, proveniente de lixiviação, do uso indiscriminado dos antibióticos ou da incompleta metabolização, podem ocorrer riscos aos organismos aquáticos e também aos consumidores desses alimentos. Um resumo desses valores de bioconcentração de diferentes compostos e espécies está apresentada na Tabela 11.

**Tabela 11.** Comparação de valores de fatores de bioconcentração de diferentes compostos e espécies.

Antibiótico	Espécie	FBC	Conclusão	Referência
Florfenicol $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ ( $\log K_{ow} 0,37$ )	Ova de caranguejo	0,5	Valores na mesma ordem de grandeza; Baixo potencial de acúmulo.	[22]
Tetraciclina $18,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ( $\log K_{ow} -1,37$ )	Larvas de <i>Chironomus riparius</i>	0,74		[83]
Ibuprofeno $250 \mu\text{g L}^{-1}$ ( $\log K_{ow} 3,97$ )	Peixes boi de cabeça	0,69		[21]
	Bagre americano	0,08		
Diclofenaco $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ( $\log K_{ow} 4,02$ )	Truta arco-íris	69-2732	Mais lipofílico; Alto potencial de acúmulo.	[82]

A bioconcentração dos antibióticos é um processo governado principalmente pela lipofilicidade da molécula, expressa pelo coeficiente de partição  $\log K_{ow}$ . Antibióticos com valores de  $\log K_{ow} > 4,0$  tendem a se acumular nos tecidos lipídicos.

Porém, a maioria dos antibióticos tem  $\log K_{ow} < 4,0$ , são encontradas no ambiente em concentrações baixas, com muitos destes compostos se comportando como ácidos ou bases fracas, que sofrem ionização no pH em condições ambientais ou são metabolizados a produtos mais polares, resultando em um baixo potencial de

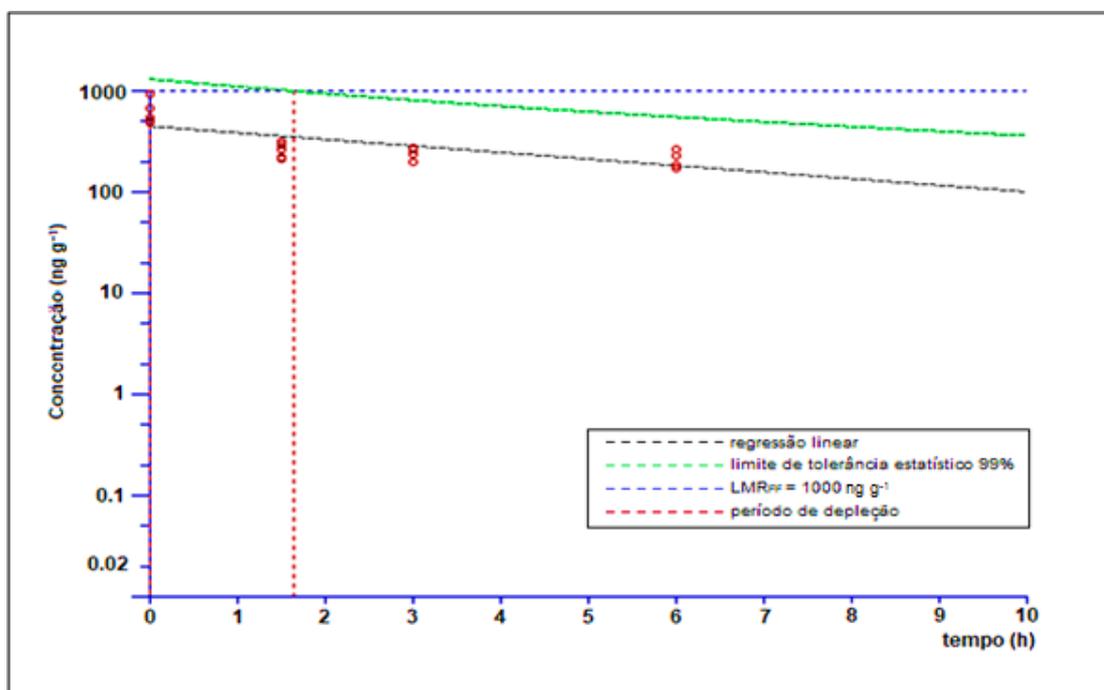
bioconcentração de antibióticos. [16]

Quanto ao metabólito florfenicol amina, não houve presença desse composto no músculo da tilápia durante o período estudado, indicando que o fármaco não foi metabolizado nesse curto período, ou que o processo de bioconcentração através da água não gerou metabólitos, pois a exposição ocorreu diretamente na pele do peixe e não pela via de alimentação.

Os resultados obtidos para a bioconcentração do florfenicol indicaram uma rápida absorção e eliminação do fármaco, com baixo potencial de acúmulo do em músculo de tilápia.

#### 4.4.4. CÁLCULO DO PERÍODO DE DEPLEÇÃO

Foi calculado o tempo necessário para a eliminação do florfenicol, até que a concentração do antibiótico no músculo fosse inferior ao LMR, de  $1000 \text{ ng g}^{-1}$ . [84] Para isto, a curva da concentração *versus* o tempo de depuração foi linearizada através de uma função logarítmica. O gráfico da Figura 34 foi obtido pelo programa “*Withdrawal-Time Calculation Program WT1.4*”, adotado pelo *Committee for Veterinary Medicinal Product (CVMP)* da União Europeia (EU). [85]



**Figura 34.** Gráfico da concentração do florfenicol em músculo de *O. niloticus* no tempo em que o limite de tolerância 99% (superior unicaudal, 95% de confiança) é inferior ao LMR, após a exposição ao antibiótico na água na concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  por 48 h. (período de depleção = 1,8 h)

O período de depleção do florfenicol em músculo de tilápia, com exposição do fármaco na água, foi dado pela intersecção entre as retas (---) e (---), correspondentes ao limite de tolerância estatístico 99% (superior unicaudal, 95% de 95% de confiança) e ao valor do LMR do florfenicol em peixes, de 1000 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. O valor encontrado foi de 1,8 h.

O valor obtido foi conferido com o uso do módulo “*Simple Regression*”, do programa *Statgraphics Centurion XVII Version 17.1.04*, [86] com fundamento na equação de regressão descrita em “*Estimation of withdrawal periods by regression analysis*”, do documento da CVMP, que foi de 1,32 h, sendo próximo ao valor obtido graficamente. [87]

O período de depleção também pode ser expresso em “°C-horas”, de modo a considerar o perfil farmacocinético do antibiótico, alterado pela influência da temperatura da água no metabolismo do peixe. Portanto, multiplicando-se o período de depleção pela média da temperatura da água durante a fase de depuração (em °C), obtém-se o valor referente a “graus-tempo”. [88] Para a temperatura de 26 °C e período de depleção de 1,8 h, o valor calculado foi de 46,8 °C-horas. Se o peixe estiver em uma temperatura diferente da estudada neste trabalho, como em 20 °C, o período de depleção seria de 2,34 h (46,8 °C-horas dividido por 20 °C). Ou seja, numa temperatura menor o peixe precisaria de um tempo maior para depurar.

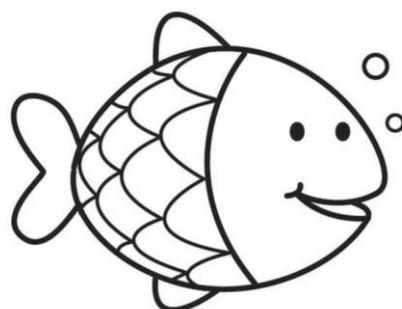
Com os valores calculados, verificou-se que a exposição da tilápia ao florfenicol na concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup> pela água não gera muito acúmulo no músculo de tilápia, sendo rapidamente eliminado, com tempo de meia vida de 4,65 h e período de depleção de 1,8 h, em que a concentração se encontra abaixo do LMR, não gerando riscos ao consumidor ou aos produtores que utilizariam esses peixes.

---

# CAPÍTULO V.

## CONCLUSÃO

---



## 5. CONCLUSÕES

Um método para determinação de florfenicol e florfenicol amina em músculo de tilápia foi desenvolvido e validado conforme os guias do MAPA [35] e da Comunidade Europeia, [34] utilizando LC-MS/MS *Ion trap*.

Foram testadas algumas técnicas de extração e as mais promissoras foram o QuEChERS modificado e o QuEChERS modificado acetato, ambas utilizando 1,0 g de amostra e C<sub>18</sub> no *clean-up*. Os parâmetros de validação avaliados para o QuEChERS modificado foram efeito matriz de -28% e -45%, recuperação de 70 a 79% e 62 a 69%, LD de 0,03 µg mL<sup>-1</sup> e 0,05 µg mL<sup>-1</sup> e LQ de 0,05 µg mL<sup>-1</sup> e de 0,10 µg mL<sup>-1</sup>, para o FF e FFA, respectivamente, indicam que esse método pode quantificar o florfenicol em valores vinte vezes abaixo do LMR. Precisão intra e interdias com coeficientes de variação ≤ 18 %, CC<sub>α</sub> de 1183 µg kg<sup>-1</sup> e o CC<sub>β</sub> de 1365 µg kg<sup>-1</sup>. Esse método apresentou facilidade de execução no preparo da amostra, devido a uma única e simples etapa de extração/*clean up*, rapidez de análise quando comparada a outros métodos convencionais, baixo consumo de amostra, reagentes e solventes e baixa geração de resíduos, estando em consonância com os princípios da química verde.

Os resultados obtidos mostraram que o método desenvolvido alcançou os objetivos propostos, podendo ser aplicado para a determinação do antibiótico florfenicol e seu metabólito florfenicol amina em amostras de músculo de tilápia.

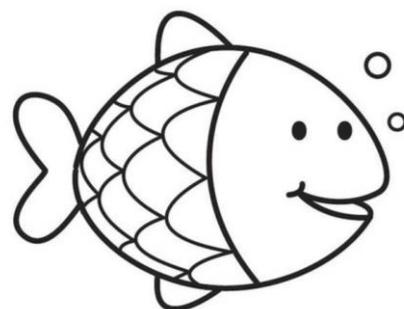
Foram determinados parâmetros farmacocinéticos do florfenicol nos músculos de tilápias expostos a este composto através da água em ensaios de bioconcentração. Quanto aos aspectos farmacocinéticos, o fator de bioconcentração obtido de 0,052 mL µg<sup>-1</sup>, calculado pela razão entre as constantes de velocidade, foi concordante com o fator de 0,053 mL µg<sup>-1</sup>, dado pela relação entre as concentrações C<sub>f</sub> e C<sub>w</sub>, indicando que se atingiu o estado de equilíbrio. Esse FBC indica que o potencial de acúmulo do florfenicol em tilápias é mínimo, com rápida absorção e eliminação do fármaco. Sendo que o valor máximo de concentração de florfenicol acumulado no filé de tilápia foi de 0,92 µg g<sup>-1</sup>, para 48 h de exposição, estando abaixo do valor de LMR e seguro para consumo.

Com esses resultados, pode-se estabelecer também protocolos para o uso seguro deste antimicrobiano no transporte de tilápia. Conclui-se que o método desenvolvido e validado pode ser utilizado em laboratórios de controle e fiscalização de resíduos de FF e de FFA em tilápia.

---

**CAPÍTULO VI.**  
**REFERÊNCIAS**  
**BIBLIOGRÁFICAS**

---



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] United Nations (ONU), World Population Prospects. Disponível em: <<https://esa.un.org/unpd/wpp/Graphs/Probabilistic/POP/TOT/>>; Acesso em: 16/12/2017.
- [2] European Commission (EC), Commission Regulation n° 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, 2009.
- [3] Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO), Definitions of Aquaculture. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/x6941e/x6941e04.htm>>, 1988, Acesso em: 16/12/2017.
- [4] Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e da Pesca, Presidência da República, Lei 11.959, Artigo 2º, 2009. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2009/Lei/L11959.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Lei/L11959.htm)>, Acesso em: 10/12/2018.
- [5] Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE), Aquicultura no Brasil: Série de estudos mercadológicos, Brasília, Distrito Federal, 2015.
- [6] Revista Food Ingredients, Proteínas do peixe, **Food Ingredients Brasil**, v. 8, 23-32, 2009.
- [7] Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO), Fishery and aquaculture statistics, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5716t.pdf>>, Acesso em: 16/12/2017.
- [8] Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO), The state of world fisheries and aquaculture, 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/i9540en/i9540EN.pdf>>, Acesso em: 10/12/2018.

- [9] Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO), El estado mundial de la pesca y la acuicultura, Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>>, Acesso em: 10/12/2018.
- [10] Associação Brasileira de Piscicultura, **Anuário Peixe BR da Piscicultura**, 2018. Disponível em: <<http://www.aquaculturebrasil.com/2018/02/19/peixe-br-lanca-o-anuario-da-piscicultura-2018/>>, Acesso em: 10/12/2018.
- [11] Keller-Costa, T.; A. Canario, V. M.; Hubbard, P. C. Chemical communication in cichlids: A mini-review, **General and Comparative Endocrinology**, v. 221, 64-74, 2015.
- [12] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Circular técnica: Produção de tilápia: Mercado, espécie, biologia e recria, ISSN 0104-7633, 2007.
- [13] Lim, C. E.; Webster, C. D. Tilapia Biology, Culture and Nutrition, Ed. **Food Products Press**, Nova York, 1ª ed., 2006.
- [14] Aly, S. M.; Nouh, W. G.; Salem-Bekhit, M. M. Bacteriological and Histopathological Studies on Enterobacteriaceae in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, 7, 94-104, 2012.
- [15] Booth, N. H.; McDonald, L. M. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 8ª ed., 997, 1992.
- [16] Regitano, J. B.; Pereira, R. M. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira, **R. Bras. Ci. Solo**, v. 34, 601-616, 2010.
- [17] Jonsson, C. M. Estudos de toxicidade e acúmulo de endossulfan nos peixes *Brachydanio rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus*, **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, Brasil, 1991.

- [18] de Voogt, P.; Muir, D. C. G.; Webster, G. R. B. Govers, H. Quantitative structure-activity relationships for the bioconcentration in fish of seven polychlorinated dibenzodioxins, **Chemosphere**, v. 21, 12, 1385-1396, 1990.
- [19] Bonansea, R. I.; Marino, D. J. G.; Bertrand, L. D.; Wunderlin, A.; Amé, M. V. Tissue-specific bioconcentration and biotransformation of *Cypermethrin* and *Chlorpyrifos* in a native fish (*Jenynsia multidentata*) exposed to these insecticides singly and in mixtures, **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, 7, 1764-1774, 2017.
- [20] Cember, H.; Curtis, E. H.; Gordon Blaylock, B. Mercury bioconcentration in fish: Temperature and concentration effects, **Environmental Pollution**, v. 17, 4, 311-319, 1978.
- [21] Nallani, G. C.; Paulos, P. M.; Constantine, L. A.; Venables, B. J.; Huggett, D. B. Bioconcentration of ibuprofen in fathead minnow (*Pimephales promelas*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*), **Chemosphere**, v. 84, 10, 1371-1377, 2011.
- [22] Zhang, R.; Pei, J.; Zhang, R.; Wang, S.; Zeng, W.; Huang, D.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Yu, K. Occurrence and distribution of antibiotics in mariculture farms, estuaries and the coast of the Beibu Gulf, China: Bioconcentration and diet safety of seafood, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 154, 27-35, 2018.
- [23] Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). Boletim estatístico da pesca e aquicultura, 129, 2010.
- [24] Plumb, D. C. **Veterinary Drug Handbook**, Ed. Wiley, Nova Jersey, 8<sup>a</sup> ed, 335-336, 2004.
- [25] Dias, H. Uso excessivo de antibiótico afeta produção de peixes, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 2014.

- [26] Alechaga, E.; Moyano, E.; Galceran, M. T. Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of phenicol drugs and florfenicol-amine in foods, **Analyst**, v. 137, 2486-2494, 2012.
- [27] Zhao, H. Y.; Zhang, G. H.; Bai, L.; Zhu, S.; Shan, Q.; Zeng, D. P.; Sun, Y. X. Pharmacokinetics of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus cuvieri*) after a single intramuscular or oral administration, **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, 460-463, 2011.
- [28] Barreto, F. M.; da Silva, M. R.; Braga, P. A. C.; Bragotto, A. P. A.; Hisano, H.; Reyes, F. G. R. Evaluation of the leaching of florfenicol from coated medicated fish feed into water, **Environmental Pollution**, v. 242, 1245-1252, 2018.
- [29] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa SDA/MAA 42/1999, 1999.
- [30] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa nº 24 de 01 de Junho de 2011, 2011.
- [31] Pan, X. D.; Wu, P. G.; Jiang, W.; Ma, B. J. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol in fish muscle by matrix solid-phase dispersion extraction (MSPD) and ultra-high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry, **Food Control**, v. 52, 34-38, 2015.
- [32] Orlando, E. A.; Roque, A. G. C.; Losekann, M. E.; Simionato, A. V. C. UPLC-MS/MS determination of florfenicol and florfenicol amine antimicrobial residues in tilapia muscle, **Journal of Chromatography B**, v. 1035, 8-15, 2016.
- [33] Rezk, M. R.; Riad, S. A. M.; Khattab, F. I.; Marzouk, H. M. Multi-residues determination of antimicrobials in fish tissues by HPLC-ESI-MS/MS method, **Journal of Chromatography B**, v. 978-979, 103-110, 2015.
- [34] European Commission (EC), Commission Regulation nº 657/2002 of 12 August 2002, 2002.

- [35] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica para Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários, CGAL/DAS, 2011.
- [36] Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO); Procedures for recommending maximum residue limits - residues of veterinary drugs in food, 2000.
- [37] Jardim, I. C. S. F.; Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas, **Scientia Chromatographica**, v. 2, 13-25, 2010.
- [38] Branco, L. C. C. Farmacocinética e depleção de resíduos do florfenicol em tambaqui (*Colossoma macropomum*), **Dissertação de mestrado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, Brasil, 2016.
- [39] Barreto, F.; Ribeiro, C.; Barcellos Hoff, R.; Dalla Costa, T. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 1449, 48-53, 2016.
- [40] Zhang, S.; Liu, Z.; Guo, X.; Cheng, L.; Wang, Z.; Shen, J. Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography B**, v. 875, 2, 399-404, 2008.
- [41] Tao, Y.; Zhu, F.; Chen, D.; Wei, H.; Pan, Y.; Wang, X.; Liu, Z.; Huang, L.; Wang, Y.; Yuan, Z. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-fenicol determination in shrimp and fish by liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry, **Food chemistry**, v. 150, 500-506, 2014.
- [42] Marques, T. V.; Paschoal, J. A. R.; Barone, R. S. C.; Cyrino, J. E. P.; Rath, S. Depletion study and estimation of withdrawal periods for florfenicol and florfenicol amine in pacu (*Piaractus mesopotamicus*), **Aquaculture Research**, v. 49, 111-119, 2018.

- [43] Phu, T. M.; Scippo, M. L.; Phuong, N. T.; Tien, C. T. K.; Son, C. H.; Dalsgaard, A. Withdrawal time for sulfamethoxazole and trimethoprim following treatment of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) and hybrid red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*), **Aquaculture**, v. 437, 256-262, 2015.
- [44] Nunes, K. S. D.; Vallim, J. H.; Assalin, M. R.; Queiroz, S. C. N.; Paraíba, L. C.; Jonsson, C. M.; Reyes, F. G. R. Depletion study, withdrawal period calculation and bioaccumulation of sulfamethazine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) treated with medicated feed, **Chemosphere**, v. 197, 89-95, 2018.
- [45] Rezaee, M.; Assadi, Y.; Hosseini, M. R. M.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116(1-2), 1-9, 2006.
- [46] Borges, K. B.; Figueiredo, E. C.; Queiroz, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: GEN LTC, 2015.
- [47] Queiroz, S. C. N.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica, v. 24, 1, 68-76, 2001.
- [48] Jardim, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas, **Scientia Chromatographica**, v. 2, 1, 13-25, 2010.
- [49] Barker, S. A.; Long, A. R.; Short, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 475(2), 353-361, 1989.
- [50] Dórea, H. S.; Lopes, W. G. Aplicação da técnica de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por CG-EM. **Química Nova**, v. 27(6), 892-896, 2004.
- [51] Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D. e Schenck, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and

Dispersive Solid-Phase Extraction for the Determination of Pesticide Residues in Produce, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 86, 3, 412-431, 2003.

[52] Lehotay, S. J.; Mastovska, K; Lightfield, A. R. 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**, v. 88, 2, 616-629, 2005.

[53] Anastassiades, M.; Scherbaum, E.; Taúdelen, B.; Štajnbaher, D. Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis, **Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety**, Ed. Wiley-VCH, Nova Jersey, 1<sup>a</sup> ed., 2007.

[54] Prestes, O. D.; Adaime, M. B.; Zanella, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos, **Scientia Chromatographica**, v. 3, 1, 51-64, 2011.

[55] Martins, M. L.; Primel, E. G.; Caldas, S. S.; Prestes, O. D.; Adaime, M. B. e Zanella, R.; Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações, **Scientia Chromatographica**, v. 4, 1, p. 35-51, 2012.

[56] Gaikowski, M. P.; Mushtaq, M.; Cassidy, P.; Meinertz, J. R.; Schleis, S. M.; Sweeney, D.; Endris, R. G. Depletion of florfenicol amine, marker residue of florfenicol, from the edible fillet of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. niloticus* and *O. niloticus* × *O. aureus*) following florfenicol administration in feed, **Aquaculture**, v. 301, 1-4, 1-6, 2010.

[57] Feng, J. B.; Jia, X. P.; Li, L. D. Tissue distribution and elimination of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. caureus*) after a single oral administration in freshwater and seawater at 28 °C, **Aquaculture**, v. 276, 1, 29-35, 2008.

[58] Maldaner, L.; Jardim, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência, **Química Nova**, v. 32, 1, 214-222, 2009.

- [59] Nogueira, N. M.; Soares, B. T. M.; Andrade, A. B. N.; Singh, A. K. Méritos comparativos da Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência em escala convencional e minituarizada, **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, 2, 44-50, 2011.
- [60] Collins, C. H.; Valente, A. L. P.; Manfredi, J. E. Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência, **Química Nova**, v. 6, 3, 103-109, 1983.
- [61] Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**, Ed. UNICAMP, Campinas, São Paulo, 1ª ed., 2006.
- [62] Chiaradia, M. C.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos, **Química Nova**, v. 31, 623-636, 2008.
- [63] Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, **Science**, 246(4926), 64-71, 1989.
- [64] Cech, N. B.; Enke, C. G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, 362-387, 2001.
- [65] Paul, W. Electromagnetic traps for charged and neutral particles, Nobel lecture, **Reviews of Modern Physics**, v. 62, 3, 1990.
- [66] Lanças, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”?, **Scientia Chromatographica**, v. 1, 2, 35-61, 2009.
- [67] Cappiello, A.; Famiglini, G.; Palma, P.; Pierini, E.; Termopoli, V.; Trufelli, H. Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, **Analytical Chemistry**, 2008.

- [68] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, 2003.
- [69] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- [70] Fedeniuk, R. W.; Mizuno, M.; Neiser, C.; O'Byrne, C. Development of LC-MS/MS methodology for the detection/determination and confirmation of chloramphenicol, chloramphenicol 3-O- $\beta$ -d-glucuronide, florfenicol, florfenicol amine and thiamphenicol residues in bovine, equine and porcine liver, **Journal of Chromatography B**, v. 991, 68-78, 2015.
- [71] Jonsson, C. M.; Hisano, H.; Paraíba, L. C. Acúmulo do florfenicol e oxitetraciclina em filé de tambaquis, tilápias e pacus através da água e da ração medicada, **Comissão de ética de uso de animais**, 2018.
- [72] Hu, J.; Hu, J.; Li, Y.; Zhang, W.; Wang, H.; Huang, C.; Zhang, M.; Wang, X. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-electron capture detection for determination of polychlorinated biphenyls in fish, **Journal of separation science**, v. 32, 2103-2108, 2009.
- [73] Tsai, W.H.; Chuang, H. Y.; Chen, H. H.; Huang, J. J.; Chen, H. C.; Cheng, S. H.; Huang, T. C. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and dispersive micro-solid-phase extraction for the determination of quinolones in swine muscle by high-performance liquid chromatography with diode-array detection, **Analytica Chimica Acta**, v. 656, 1, 56-62, 2009.
- [74] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD 305) Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure, **Guidelines for testing of chemicals**, 2012.
- [75] Elimam, M. M.; Shantier, S. W.; Gadkariem, E. A.; Mohamed, M. A.; Osman, Z. Stability studies on florfenicol using developed derivative spectrophotometric methods, **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 75, 1, 40-44, 2017.

- [76] Klein, S.; Bueno, G. W.; Lorenz, E. K.; Diemer, O.; Feiden, A.; Boscolo, W. R. Aditivos na água de transporte de *Piaractus mesopotamicus*: Efeitos sobre a sobrevivência após estocagem em tanques-rede, **Zootecnia Trop.**, v. 31, 3, 255-260, 2013.
- [77] Oliver, B. G.; Niimi, A. J. Bioconcentration factors of some halogenated organics for rainbow trout: limitations in their use for prediction of environmental residues, **Environmental Science & Technology**, v. 19, 9, 842-849, 1985.
- [78] Ellgehausen, H.; Guth, J. A.; Esser, H. O. Factors determining the bioaccumulation potential of pesticides in the individual compartments of aquatic food chains, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 4, 2, 134-157, 1980.
- [79] Food and Drug Administration (FDA), Code of Federal Regulation, title 21, v. 6, 2018. Disponível em: < <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=556.283> >, Acesso em: 12/12/2018.
- [80] Wei, R.; Ge, F.; Chen, M.; Wang, R. Occurrence of Ciprofloxacin, Enrofloxacin, and Florfenicol in Animal Wastewater and Water Resources, **Journal of Environmental Quality**, v. 41, 5, 1481-1486, 2012.
- [81] Zong, H.; Ma, D.; Wang, J.; Hu, J. Research on Florfenicol Residue in Coastal Area of Dalian (Northern China) and Analysis of Functional Diversity of the Microbial Community in Marine Sediment, **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, 2, 245-249, 2010.
- [82] Schwaiger, J.; Ferling, H.; Mallow, U.; Wintermayr, H.; Negele, R. D. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout, **Aquatic Toxicology**, v. 68, 2, 141-150, 2004.
- [83] Xie, Z.; Tang, J.; Wu, X.; Li, X.; Hua, R. Bioconcentration, metabolism and the effects of tetracycline on multiple biomarkers in *Chironomus riparius* larvae, **Science of The Total Environment**, v. 649, 1590-1598, 2019.

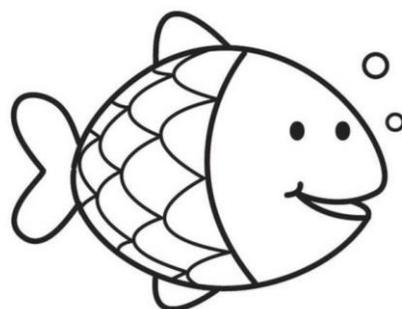
- [84] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); Instrução Normativa nº 24 de 01 de Junho de 2011, 2011.
- [85] Elazab, S. T.; Gabr, M. G.; Amer, M. S.; El-Nabtity, S. M.; Hsu, W. H. Depletion of cefquinome from rabbit tissues, **International Journal of Innovation and Applied Studies**, v. 18, 3, 743-748, 2016.
- [86] Statgraphics Technologies. Statgraphics Centurion XVII (Version 17.1.04), StatPoint Technologies, Herndon, Virginia, Estados Unidos, 2014.
- [87] European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP), Guideline on determination of withdrawal periods for edible tissues, 2018. Disponível em: < [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-determination-withdrawal-periods-edible-tissues-revision\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-determination-withdrawal-periods-edible-tissues-revision_en.pdf)>. Acesso em: 03/01/2019.
- [88] Lucchetti, D.; Fabrizi, L.; Guandalini, E.; Podestà, E.; Marvasi, L.; Zaghini, A.; Coni, E. Long depletion time of enrofloxacin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 48, 10, 3912-3917, 2004.

---

# CAPÍTULO VII.

## ANEXO

---



Protocolo da comissão de ética de uso de animais: Acúmulo do florfenicol e oxitetraciclina em filé de tambaquis, tilápias e pacus através da água e da ração medicada



**Meio Ambiente**

M.CEUA.CNPMA Nº 3

Jaguariúna, 07 de fevereiro de 2018.

Claudio Martin Jonsson  
Embrapa Meio Ambiente

**AUTORIZAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES DE ENSINO OU DE PESQUISA CIENTÍFICA**

Certificamos que a proposta intitulada "Acúmulo do florfenicol e oxitetraciclina em filé de tambaquis, tilápias e pacus através da água e da ração medicada", registrada com o nº 007/2017, sob a responsabilidade de Claudio Martin Jonsson que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente, em reunião de 07/02/2018.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	12/02/17 a 12/02/21
Espécie/linhagem/raça	<i>Colossoma macropomum</i> (tambaqui); <i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia); <i>Piaractus mesopotamicus</i> (pacus)
Nº de animais	1500
Peso/Idade	30 g
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Piscicultura Poletini; Rodovia Agricultores km 9,5; Mogi-Mirim / SP

Coordenadora da CEUA

Secretário da CEUA