



KÁTIA SANTOS DAMACENA NUNES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA
DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS E TRIMETOPRIM EM TILÁPIA POR
UPLC-ESI-QToF MS**

Campinas

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

KÁTIA SANTOS DAMACENA NUNES

**"DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA
DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS E TRIMETOPRIM EM TILÁPIA POR
UPLC-ESI-QToF MS "**

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título para obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

Co-Orientadora: Dra. Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA KÁTIA SANTOS DAMACENA NUNES
E ORIENTADA PELO PROF. DR. FELIX G. R. REYES.
Assinatura do Orientador

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

**Campinas
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

N922d Nunes, Kátia Santos Damacena, 1970-
Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para determinação de sulfonamidas e trimetoprim em tilápia por UPLC-ESI-QToF-MS / Kátia Santos Damacena Nunes. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Felix Guillermo Reyes Reyes.

Coorientador: Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Resíduos. 2. Sulfonamidas. 3. Trimetoprim. I. Reyes Reyes, Felix Guillermo. II. Queiroz, Sonia Claudia do Nascimento. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development and validation of a multiresidue method for the determination of sulfonamides and trimethoprim in tilapia by UPLC-ESI-QToF-MS

Palavras-chave em inglês:

Residues

Sulfonamides

Trimethoprim

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Felix Guillermo Reyes Reyes [Orientador]

Vera Lúcia Ferracini

Fabiana Pilarski

Data de defesa: 28-11-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
Presidente

Profa. Dra. Fabiana Pilarski
Membro Titular
Centro de Aquicultura - UNESP

Dra. Vera Lúcia Ferracini
Membro Titular
EMBRAPA MEIO AMBIENTE

Dr. Claudio Martin Jonsson (EMBRAPA MEIO AMBIENTE)
Membro Suplente
EMBRAPA MEIO AMBIENTE

Dra. Márcia Regina Assalin
Membro Suplente
EMBRAPA MEIO AMBIENTE

Campinas
2013

RESUMO GERAL

A aquicultura é hoje o setor de produção mundial de alimentos que apresenta o maior crescimento. Compreende todas as formas de criação de animais e cultivo de plantas aquáticas em água doce, salobra e marinho. Um grande constrangimento para o setor são os surtos de doenças, com uma estimativa global de perdas da ordem de muitos bilhões de dólares por ano. Este fato ocorre devido a que o ambiente aquático é mais favorável a proliferação de bactérias patogênicas, podendo atingir altas densidades em torno dos animais e ser ingeridas durante a alimentação ou durante as trocas gasosas. Assim, o risco de infecções bacterianas na criação de peixes é alto, podendo ser consequência de fatores estressantes tais como falta de higiene, alta densidade de estocagem, baixa qualidade da água, flutuação da temperatura, nutrição inadequada, más práticas de manejo, inadequados procedimentos e métodos de transporte, adaptação ao novo ambiente e captura. Na tentativa de minimizar perdas, antibióticos são administrados, através dos alimentos, aos peixes com fins terapêuticos (tratamento de doença). Devido ao seu baixo custo e relativa eficiência em combater infecções bacterianas mais comuns, as sulfonamidas pertencem a uma classe de antibióticos largamente usada. Trimetoprim é outro agente antibiótico frequentemente co-administrado com sulfonamidas para aumentar, de forma sinérgica, a eficiência do tratamento contra uma variedade de infecções bacterianas. Entretanto, o uso de antimicrobianos como agentes quimioterapêuticos tem criado problemas devido ao seu efeito tóxico, desenvolvimento de resistência microbiana, resíduo acumulativo e consequências à saúde pública e ao meio ambiente. O monitoramento dos resíduos de quimioterapêuticos em alimentos tem se tornado prioritário para o controle de resíduos de contaminantes na cadeia de produção de alimentos de origem animal. Nos últimos anos, ocorreu um rápido desenvolvimento de novos métodos analíticos, para a determinação destes resíduos. Dentre os métodos de análise mais promissores, inclui-se a técnica de preparo de amostras denominada QuEChERS (“*QuEChERS - Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*”), o qual foi empregado neste estudo. Para a quantificação dos resíduos foi utilizada a técnica UPLC-ESI-QToF MS, por se tratar de um método altamente seletivo na determinação de moléculas orgânicas sendo, atualmente, uma das técnicas mais modernas de quantificação de resíduos em alimentos, permitindo níveis de quantificação na ordem de

ng/g de matriz. No presente estudo, para fins de desenvolvimento e validação do método analítico foi considerado o limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido na União Europeia (EU) (100 ng g^{-1}). O método desenvolvido foi validado em conformidade aos guias de validação da EU e do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil, tendo apresentado seletividade sem efeito matriz para as sulfonamidas estudadas. A precisão (intra e interdias) verificada apresentou coeficiente de variação (CV %) menor do que 20 %. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram 1 ng g^{-1} e 5 ng g^{-1} , respectivamente. Para as sulfonamidas o valor de $CC\alpha$ variou entre 102,6 e 120,0, e para $CC\beta$ entre 111,7 e 140,1. Para o trimetoprim o valor de $CC\alpha$ e $CC\beta$ foi de 70,0 e 89,9, respectivamente. Os resultados obtidos indicam que o método é apropriado para a determinação de sulfonamidas e trimetoprim em filés de tilápia.

ABSTRACT

The aquaculture is at present one of the food production sectors with the highest expansion. It comprises all forms of animal and vegetal aquatic cultures and plants in the fresh water, brackish and marine environments. A major drawback for the sector is the disease outbreaks, with estimated overall losses of several billion dollars per year. This fact occurs because the aquatic environment is more favorable to pathogenic bacteria, regardless of the animal specie, they could reach high densities around them and be ingested during feeding or when they ingest water. Thus, the risk of bacterial infections in fish farming is high and may be due to stress factors such as poor hygiene, overcrowding, poor water quality, temperature fluctuation, poor nutrition, poor management practices, careless handling, improper procedures and transport methods, adaptation to the new environment and capture. In an attempt to minimize losses, antibiotics are administered, by means of the food, to fish for therapeutic (to treat disease) purposes, in aquaculture facilities throughout the world. Due to its low cost and effectiveness in overcoming the most common bacterial infections, sulfonamides are a class of widely used antibiotics. Trimethoprim is another antibiotic agent frequently employed in conjunction with sulphonamides to increase, synergistically, the power of treatment against a variety of bacterial infections. The use of antibiotics or chemotherapeutics has created problems due to its toxic effects, bacterial resistance induction, cumulative and residual effects to public health and to the environment. The monitoring of veterinary drug residues in food has become a main concern for the control of residues of contaminants in the production chain of animal foods. In recent years, there was a fast development of new analytical methods for determination of these residues. Among the most promising methods of analysis it is found the technique of sample preparation called "QuEChERS - Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe", which was used in this study. UPLC-ESI-QToF MS technique was used in the quantification of the residues, since it is a highly selective method for the determination of organic molecules, currently, being one of the most modern techniques for quantifying residues in food, enabling the possibility to quantify residues in the order of ng g^{-1} . In the present study, for the purpose of development and validation of the analytical method it was considered the maximum residue limit (MRL) established in Japan (20 ng g^{-1}), which

is lower than that established in the European Union (EU) (100 ng g^{-1}). The method was validated according to the validation guidelines of the EU and the Brazilian Ministry of Agriculture Livestock and Supply (MAPA), having presented selectivity and no matrix effect for the sulfonamides studied. The precision (intra-and interday) showed a coefficient of variation (CV %) less than 20 %. The limits for detection (LOD) and quantification (LOQ) were 1 ng g^{-1} and 5 ng g^{-1} , respectively. The results indicate that the method is suitable for the determination of sulfonamides and trimethoprim in tilapia fillets. For sulfonamides, the value of $CC\alpha$ varied between 102.6 and 120.0, and 111.7 and 140.1 between $CC\beta$. For the value of trimethoprim and $CC\alpha$ $CC\beta$ was 70.0 and 89.9, respectively. The results indicate that the method is suitable for the determination of sulfonamides and trimethoprim in tilapia fillets.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	VII
ABSTRACT.....	IX
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	04
CAPITULO I	
Ensuring Food Safety in Developing and Developed Countries: Aspects associated to the use of veterinary drugs in fish farming in Brazil.....	07
Summary.....	09
Introduction.....	11
Risk assessment.....	13
Health-based guidance values.....	16
Risk Characterization.....	17
Analytical Methods.....	18
Fish farming.....	19
Use of veterinary drugs in fish farming.....	23
Regulatory aspects of veterinary drugs.....	25
Final Considerations.....	27
References.....	29
CAPITULO II	
Considerações sobre o uso de sulfonamidas na produção de alimentos de origem animal no Brasil e no mundo.....	39
Resumo.....	41
Abstract.....	43
Introdução.....	45
Revisão bibliográfica.....	46
Emprego das sulfonamidas no mercado mundial.....	47
Aspectos regulatórios.....	51
Aspectos analíticos.....	55
Aspectos de farmacocinética.....	60
Considerações Finais.....	63
Referências Bibliográficas.....	64
CAPÍTULO III	
Determinação de resíduos de sulfonamidas e trimetoprim em filá de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>) empregando UPLC-ESI-QTOF MS.....	73
Resumo.....	75
Abstract.....	77
Introdução.....	79
Materiais e métodos.....	85
Resultados e Discussão.....	91
Validação do método desenvolvido.....	94
Conclusões.....	106
Referências bibliográficas.....	107
CONCLUSÕES GERAIS.....	113

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Maria Antonia e Francisco, que sempre fizeram de tudo por mim

Aos meus queridos irmãos Donizete e Danilo que sempre estão ao meu lado

Ao meu querido esposo Sidney Nunes por todo amor e dedicação incondicional

Às minhas queridas Edmárcia e sobrinha Gabriela

OFEREÇO-LHES ESTE TRABALHO EM FORMA DE AGRADECIMENTO POR

TUDO APOIO, AMOR E DEDICAÇÃO

MUITO OBRIGADA!

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado forças e coragem suficiente para enfrentar a longa distância entre meu coração e o meu local de trabalho.

Ao Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes por me aceitar em seu grupo de pesquisa, por toda amizade, preocupação e orientação fornecida.

À Dra. Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz e a Dra. Márcia Regina Assalin por me socorrerem a hora que mais precisei, disponibilizando seu centro de pesquisa e equipamentos para a realização deste trabalho e pelas valiosas correções.

À Dra. Vera Lucia Ferracini pelo apoio, sugestões e valiosas correções.

À Dra. Fabiana Pilarski pelo apoio, ensinamentos e valiosas correções.

Ao Prof. Dr. Claudio Martin Jonsson por toda orientação e por disponibilizar seu centro de pesquisa para a realização de parte do experimento e pelas valiosas correções deste trabalho.

Ao Me. José Henrique Vallim por ter trabalhado tão arduamente ao meu lado e por toda amizade.

À Ma. Luciana Castello Branco pelo grande apoio e amizade.

Aos estagiários Éder de Vilhena Araújo e Victor Chalupe pelo grande esforço para a realização deste trabalho.

Às demais amigas do Laboratório de Toxicologia da FEA-UNICAMP: Rafaela de Carvalho Baptista, Michelle Del Bianchi, Maria José Lima, Karin Brigitte Fehsenfeld, Juliana Teles, Patrícia Aparecida Campos Braga, Claudia Schinke e Tamires Martins pelo apoio, conselhos e amizade.

Aos demais amigos do LRC - Laboratório de Resíduos e Contaminantes da EMBRAPA Meio Ambiente: Dra. Débora Cassoli, Dra. Maria Rosa, Márcia Godoy, Marley Tavares e

Geane, que me receberam de braços abertos e estavam sempre a disposição para ajudar no que fosse possível.

Às demais amigas do LEB - Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança da EMBRAPA Meio Ambiente: Neuza Domingos, Nenê Moraes e Eliane Alves que me receberam de braços abertos e estavam sempre a disposição para ajudar no que fosse possível.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da UNICAMP pela oportunidade de concretização deste trabalho.

À EMBRAPA Meio Ambiente de Jaguariúna por disponibilizar a realização deste trabalho no Laboratório de Resíduos e Contaminantes (LRC) e no Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança (LEB).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de mestrado concedida.

À CAUNESP por ter fornecido as tilápias empregadas como branco neste estudo.

À CESP pelos ensinamentos básicos necessários para a estruturação deste projeto, especialmente ao Eng. Edmur Donola.

Finalmente, agradeço a longa lista de pessoas que me deram apoio de forma direta ou indireta, pela torcida, energia positiva e carinho.

MUITO OBRIGADA!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I.	Ensuring Food Safety in Developing and Developed Countries: Aspects associated to the use of veterinary drugs in fish farming in Brazil	
Figure 1.	Components of risk analysis (FAO/WHO, 1997).....	13
Figure 2.	Steps of risk assessment (FAO/WHO, 1997).....	14
Figure 3.	Structures of veterinary drugs officially approves in Brazil for use in fish farming.....	26
Capítulo III.	Determinação de resíduos de sulfonamidas e trimetoprim em filá de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>) empregando UPLC-ESI-QToF MS	
Figura 1.	Fórmula estrutural geral das sulfonamidas.....	80
Figura 2.	Fórmula estrutural dos grupos funcionais substitutivos ao grupo R da fórmula geral das sulfonamidas.....	80
Figura 3.	Fórmula estrutural do trimetoprim.....	83
Figura 4.	Mecanismo de ação das sulfonamidas e trimetoprim na célula bacteriana.....	83
Figura 5.	Cromatograma da amostra branco.....	95
Figura 6.	Cromatogramas extraídos das amostras branco fortificadas com as sulfonamidas e trimetoprim na concentração de 250 ng g ⁻¹	96
Figura 7.	Exemplo de avaliação do efeito matriz, sensibilidade e linearidade por meio das curvas analíticas da sulfadimetoxina (SDMX) no solvente, extrato e matriz.....	99

LISTA DE TABELAS

Capítulo I. Ensuring Food Safety in Developing and Developed Countries: Aspects associated to the use of veterinary drugs in fish farming in Brazil

Table 1.	Work conducted in Brazil related to the development and validation of analytical method for the determination of veterinary drug residues in fish and determination of the withdrawal period under Brazilian environmental conditions.....	20
Table 2.	Brazilian annual production (tons) of continental and marine aquaculture from 2008 to 2010.....	21

Capítulo II. Considerações sobre o uso de sulfonamidas na produção de alimentos de origem animal no Brasil e no mundo

Tabela 1.	Doenças mais comuns em diferentes espécies de animais tratados com sulfonamidas.....	50
Tabela 2.	Sulfonamidas monitoradas pelo PNCRC.....	52
Tabela 3.	Métodos analíticos descritos na literatura para a determinação de sulfonamidas em diferentes.....	56
Tabela 4.	Valores de LMR, IDA e períodos de carência para sulfonamidas em diferentes matrizes.....	61

Capítulo III. Determinação de resíduos de sulfonamidas e trimetoprim em filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*) empregando UPLC-ESI-QToF MS

Tabela 1.	Constantes de dissociação para o equilíbrio envolvendo as sulfas em água e nas misturas acetonitrila-água.....	82
Tabela 2.	Estudo do uso de massa de filé de tilápia no método QuEChERS e da massa de sais empregados na etapa <i>salting out</i>	94
Tabela 3.	Fórmula molecular, massa molecular calculada, massa do íon molecular e tempo de retenção das sulfonamidas e trimetoprim.....	97
Tabela 4.	Padrões Sulfonamidas e Trimetoprim: equação da curva, coeficiente de correlação linear (r^2) e coeficiente angular (a).....	100
Tabela 5.	Parâmetros de validação das sulfonamidas e trimetoprim na curva do extrato e solvente.....	101
Tabela 6.	Parâmetros de CV em porcentagem (%) para Precisão intradia e Precisão Interdia.....	103
Tabela 7.	Valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ para sulfonamidas e trimetoprim em filé de tilápia.....	105

Lista de abreviaturas e siglas

Ac-SMZ	N4-Acetilsulfametazina
ADI (IDA)	" <i>Acceptable Daily Intake</i> " (Ingestão Diária Aceitável)
AMR	" <i>Antimicrobial Resistance</i> " (Resistência Antimicrobiana)
ANVISA	Agência Nacional De Vigilância Sanitária
AOAC	" <i>Association of Official Analytical Chemist</i> " (Associação Oficial de Química Analítica)
BMD	" <i>Benchmark Dose</i> " (Dose Terapêutica)
BNDES	Banco Nacional do Desenvolvimento
BPA	Boas Práticas Agropecuárias
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAC	" <i>Codex Alimentarius Commission</i> " (Comissão Código Alimentar)
CC α	" <i>Limit of decision for confirmatory analysis</i> " (Limite de decisão análise confirmatória)
CC β	" <i>Capacity of detection for screening analysis</i> " (Capacidade de detecção para análise)
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CV	" <i>Crystal Violet</i> " (Cristal Violeta)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
D-SPE	" <i>Dispersive Solid Phase Extraction</i> " (Extração em Fase Sólida Dispersiva)
EC	Comunidade Européia
EMA	" <i>European Medicines Agency</i> " (Agência Européia de Medicina)
EU	" <i>European Union</i> " (União Européia)
EUA	Estados Unidos
FAC	" <i>Food Additives And Contaminants</i> " (Aditivos Alimentares e Contaminantes)
FAO	" <i>Food And Agriculture Organization</i> " (Organização Alimentos e Agricultura)
FDA	" <i>Food and Drug Administration</i> " (Administração Alimentos e Fármacos)
FLD	" <i>Postcolumn Fluorescence Derivatization</i> " (Derivatização Coluna de Fluorescência)
GPVD	" <i>Good Practices In The Use Of Veterinary Drugs</i> " (Boas Práticas no uso de Drogas veterinárias)
GTA	Guias de Trânsito Animal
HACCP	" <i>Hazard Analysis And Critical Control Points</i> " (Análise de Riscos e Controle dos Pontos Críticos)
HPLC	" <i>High-performance liquid chromatography</i> " (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
JECFA	" <i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i> " (Comitê FAO/WHO de Especialistas em Aditivos Alimentares)
LC	" <i>Liquid Chromatograph</i> " (Cromatografia Líquida)
LC-ESI-MS/MS	" <i>LC-electrospray tandem mass spectrometry</i> " (Cromatografia Líquida-eletrospray seguido de espectrometria de massas)

LC-MS	" <i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i> " (Cromatografia Líquida-espectrometria de massas)
LC-MS/MS	" <i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry</i> " (Cromatografia Líquida- seguido de espectrometria de massas)
LC-QToF MS	" <i>Liquid chromatography - Quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i> " (Cromatografia Líquida-espectrometro de massas quadrupolo tempo de voo)
LC-ToF MS	" <i>Liquid chromatography - time-of-flight mass spectrometry</i> " (Cromatografia Líquida-espectrometro de massas- tempo de voo)
LCV	" <i>Leucocrystal Violet</i> " (Leucocristal Violeta)
LMG	" <i>Leucomalachite Green</i> " (Leucomalaquita Verde)
LMR	Limite Máximo de Resíduo
LOAEL	" <i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i> "
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mercosul	Mercado Comum do Cone Sul
MG	" <i>Malachite Green</i> " (Verde Malaquita)
MPA	Ministério da Pesca e Agricultura
MRL	" <i>Maximum Residue Limit</i> " (Limite Máximo de Resíduo- LMR)
MRPL	" <i>Minimum Required Performance Limits</i> " (Limites Mínimos de Desempenho Requerido)
MSPD	" <i>Matrix Solid Phase Dispersion</i> " (Dispersão em Fase Sólida da Matriz)
NOAEL	" <i>No-Observed-Adverse-Effect Level</i> " (Nível de Efeito adverso não observado)
NSAIDs	Drogas Antiinflamatórios não Esteriodais
OIE	Organização Internacional das Epizootias
OMS	Organização Mundial da Saúde
OTC	" <i>Over-the-counter</i> " (Contagem Acima)
PABA	Ácido Para-Aminobenzóico
PAMVet	Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários
pH	potencial hidrogeniônico
PNCRB	Programa Setorial de Controle de Resíduos e Contaminantes em Pescado
PNCRC	Plano do Controle Nacional de Resíduos e Contaminates
POD	" <i>Point of Departure</i> " (Ponto de Partida)
ppm	partes por milhão
PSA	" <i>Primary Secondary Amina</i> " (Amina Primária-Secundária)
PTFE	Politetrafluoretileno
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
QToF	" <i>Quadrupole time-of-flight</i> " (Quadrupolo tempo-de-voo)

QuEChERS	<i>"Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe"</i> (Rápido Fácil Barato Efetivo Robusto Seguro)
RCAAP	Repositório Científico de Acesso Aberto de Portugal
ROA	Requisição Oficial de Análises
SA	Sulfas
SAM	Sulfacetamida
SAN	Sulfanilamida
SCP	Sulfaclorpiridazina
SCPA	Sulfaclorpiridazina
SDD	Sulfadimidina
SDD	Sulfadimidina
SDMX	Sulfadimetoxina
SDZ	Sulfadiazina
SG	Sulfaguanidina
SIF	Sistema de Inspeção Federal
Sindan	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos Para Saúde Animal
SIX	Sulfisoxazole
SMMX	Sulfamonometoxina
SMPD	Sulfametoxipiridazina
SMR	Sulfamerazina
SMT	Sulfametizole
SMX	Sulfametoxazole
SMZ	Sulfametazina
SP	Sulfapiridina
SPE	<i>"Solid Phase Extraction"</i> (Extração em Fase Sólida)
SPS	<i>"Sanitary And Phytosanitary Measures"</i> (Medidas Sanitárias e Fitosanitárias)
SQ	Sulfaquinoxalina
SSZ	Sulfasalazina
STZ	Sulfatiazole
TBT	<i>"Technical Barriers to Trade"</i> (Barreiras Técnicas ao Comércio)
TDI	<i>"Threshold Daily Intake"</i> (Limiar de Ingestão Diária)
TMP	Trimetoprim
WHO	<i>"World Health Organization"</i> (Organização Mundial da Saúde)
WTO	<i>"World Trade Organization"</i> (Organização Mundial do Comércio)

INTRODUÇÃO GERAL

No mercado global, a segurança e a qualidade dos produtos alimentícios têm se tornado uma preocupação crescente pelos consumidores, governos e produtores. Questões relativas à segurança alimentar e à percepção pública de salubridade têm se apresentado cada vez mais importante para todos os produtos alimentícios (Malik, 2010).

Com o rápido crescimento populacional no século 20, verificou-se nos últimos 50 anos um acentuado aumento pela demanda de produtos aquáticos, incluindo peixes, crustáceos e mariscos. Os métodos de criação são caracterizados por alta densidade e volume de estoque, grande quantidade de alimentos formulados com antibióticos, antifúngicos e outras formulações farmacêuticas; aplicação constante de pesticidas e desinfetantes. Muitos pesquisadores e grupos de estudos têm avaliado o papel da segurança alimentar associado à aquicultura intensiva, mas numerosas lacunas têm permanecido. Um exemplo seria o tipo e a quantidade de contaminantes químicos e biológicos presentes em sistemas aquícolas e subsequentes resíduos em alimentos, os quais não são completamente conhecidos, seja em escala local, nacional ou global. Como resultado, o efeito sobre a segurança alimentar e saúde humana é de difícil avaliação (Sapkota, 2008).

Durante a última década, penicilinas e sulfonamidas tem sido os antimicrobianos mais comumente utilizados na medicina veterinária para tratar infecções bacterianas e outras doenças, ou com propósitos profiláticos e preventivos. Além disso, também são utilizados como suplementos ilegais para aumentar a eficiência da ração e o ganho de peso na produção de alimentos de origem animal. Como consequência do uso de substâncias antimicrobianas em animais, os resíduos destas substâncias podem chegar até os humanos através do consumo de alimentos de origem animal (Kantiani, 2010).

O quadro legislativo da Segurança Alimentar é um determinante crítico para a solidez dos métodos analíticos que podem ser desenvolvidos. A legislação da Segurança Alimentar não é harmonizada em todo o mundo. No entanto, alguns órgãos internacionais são bastante reconhecidos, sendo o mais representativo o "*Codex Alimentarius Commission*", oficializado pela FAO e WHO, responsável pelas normas "*risk-based food safe standards*" que servem como uma referência no mercado internacional e um modelo para que países o utilizem em sua legislação (Malik, 2010). No Brasil, o Plano de Controle Nacional de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) tem estabelecido o monitoramento de um

crescente número de fármacos veterinários em produtos de origem animal e tem-se tornado uma referência essencial para a implementação de um rigoroso procedimento de inspeção e regras da saúde pública (Lopes, 2012).

Em 2006, a Comissão Europeia (Commission Recommendation 2005/95/EC) proibiu o uso de antibióticos como aditivos alimentares e promotores de crescimento (Cronly, 2010). No Brasil, somente podem ser utilizados aditivos autorizados por normas editadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) ou consagradas no Mercado Comum do Cone Sul (Mercosul). Os setores de carnes (bovinos, suínos, caprinos, equinos e aves/ovos) e de aves/ovos têm os limites da quantidade de aditivos definidos pela Instrução Normativa 51/2006, elaborada com base em dados do Ministério da Saúde. No setor de pescados, os limites das quantidades de aditivos estão listados em estudo conjunto de países membros do Mercosul. Em caso de produto não constante na lista, adota-se o "Codex Alimentarius" como base de referência. Antibióticos, entre eles as sulfonamidas, são de uso proibido como aditivos alimentares (MAPA, 2013).

Para garantir a segurança humana e animal, atualmente os antibióticos possuem seu uso reservado estritamente o tratamento de doenças (Boscher, 2010). Todavia, antibióticos podem estar presentes em produtos alimentícios de origem animal, seja pelo uso ilegal na alimentação animal, ou contaminação cruzada involuntária. Para exemplificar, no Brasil, por meio do programa de monitoramento PNCRC em 2008, foram monitoradas amostras de bovinos, suínos, aves (inclusive ovos), pescados de cultivo (inclusive camarão), equinos, leite e mel. Do total das amostras monitoradas (19.211), 28 apresentaram não conformidade. Em peixes e camarão de cultivo, onde apenas 63 amostras foram monitoradas, não foi encontrado nenhuma não conformidade. Para sulfonamidas, cujo LMR é de 100 ug/kg, as violações ocorreram na matriz suíno (fígado), das 214 amostras analisadas, 02 apresentaram resíduos de sulfametazina (2262,5 ug/kg e 165 ug/kg). Para aves (fígado), das 229 amostras monitoradas 01 apresentou sulfaquinoxalina (229,0 ug/kg) (MAPA, 2009). O monitoramento de resíduos de antibióticos na alimentação animal é importante para controlar a contaminação na cadeia de alimentar que, potencialmente, pode resultar em efeitos nocivos à saúde de animais e consumidores, infringindo as boas práticas de produção (Boscher, 2010).

Em resposta ao imprevisível aumento da ameaça à saúde pública, o desenvolvimento de métodos analíticos altamente sensíveis para determinação de sulfonamidas em várias matrizes de amostras tais como alimentos, tecidos animais e água do meio ambiente é urgentemente necessário (Cheng, 2011).

Para identificar o risco potencial das sulfonamidas para consumidores, relacionado ao consumo de alimento, métodos analíticos específicos e sensíveis são necessários para um concreto monitoramento de seus níveis de resíduos. Estes métodos analíticos devem estar de acordo com critérios oficiais de validação, tais como da Comissão Europeia (Commission Decision 2002/657/EC) e do MAPA (2011), sendo que a soma total dos resíduos de todas as substâncias do grupo não pode exceder 100 µg kg⁻¹ (Lu, 2011).

A determinação de resíduos químicos de compostos com relevância toxicológica em amostras biológicas permitiu um apoio essencial para controle de "doping" e avaliação da segurança alimentar e ambiental. Hoje em dia, métodos específicos de análise permitem a obtenção de alta qualidade de análise de um particular subconjunto de substâncias químicas. Particularmente, cromatografia líquida associada a espectrometria de massa em sequência (LC-MS), com modo de monitoramento de reações múltiplas, é a primeira escolha para a quantificação sensível, acurada e simultânea de moléculas presentes em matrizes complexas. Este tipo de método, que é tipicamente baseado na medição exata de massa com alta resolução em conjunto com técnicas de processamento de dados pós-adquiridos, se tornou crescentemente popular para o procedimento denominado "general unknown screening" (varredura geral do desconhecido) devido à capacidade de detecção de um número teoricamente ilimitado de analitos tais como metabólitos desconhecidos, produtos de degradação e espécies inesperadas (Huang, 2012).

O objetivo do presente estudo foi desenvolver de um método de extração multirresíduo para análise de sulfonamidas e trimetoprim em filé de tilápia usando UPLC-ESI-QToF MS. O método de extração foi baseado na técnica QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe), a qual foi modificada para se adequar a extração de resíduos de sulfonamidas e trimetoprim em filé de tilápia.

Referências bibliográficas

- Boscher, A.; Guignard, C.; Pellet, T.; Hoffmann, L.; Bohn, T.; Development of a multiclass method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** . v. 1217, p.6394-6404, 2010.
- Cheng, Y.; Huang, S. Singco, B.; Huang, H. Analyses of sulfonamide antibiotics in meat samples by on-line concentration capillary electrochromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v.1218, p. 7640-7647, 2011.
- Cronly, M.; Behan, P.; Foley, B.; Malone, E.; Earley, S.; Gallagher, M.; Shearan, P.; Regan, L.; Development and validation of a rapid multi-class method for confirmation of fourteen prohibited medicinal additives in pig and poultry compound feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 53, p. 929-938, 2010.
- Huang, C.; Bin, G.; Wang, X.; Li, J.; Zhu, W.; Chen, B.; Ouyang, S.; A generic approach for expanding homolog-targeted residue screening of sulfonamides using a fast matrix separation and class-specific fragmentation-dependent acquisition with a hybrid quadrupole-linear ion trap mass spectrometer. **Analytica Chimica Acta**. v. 737, p.83-98, 2012.
- Kantiani, L.; Farré, M.; Freixiedas, J. M. G. I.; Barceló, D.; Development and validation of a pressurised liquid extraction liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for β -lactams and sulfonamides in animal feed. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4247-4254, 2010.
- Lopes, R. P.; Passos, E. E. F.; Filho, J. F. A. ; Vargas, E. A.; Augusti, D. V.; Augusti, R.; Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis. **Food Control**, no. 28, p. 192-198, 2012.
- Lu, Y.; Shen, Q.; Dai, Z.; Zang, H.; Wang, H.; Development of an on-line matrix solid-phase dispersion/fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry system for

- the rapid and simultaneous determination of 13 sulfonamides in grass carp tissues. **Journal of Chromatography A**. v. 1218, p. 929-937, 2011.
- Malik, A. K.; Blasco, C. Picó, Y. Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. **Journal of Chromatography A**. v. 1217, p. 4018-4040, 2010.
- MAPA, 2013. "Lista dos aditivos proibidos na alimentação animal e legislação correspondente". Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/aditivos-proibidos>>. Acesso em, 05/03/2013.
- MAPA, 2011. "Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica". Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Guia%20de%20valida%C3%A7%C3%A3o%20e%20controle%20de%20qualidade%20analitica.pdf> Acesso em, 05/05/2012.
- MAPA, 2009. Instrução Normativa n.o 15, de 25 de maio de 2009. "Resultados do monitoramento dos programas de controle de resíduos e contaminantes em carnes (bovina, suína e equina), leite, mel, ovos e pescado no exercício de 2008". Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2015-2009.pdf> acesso em, 20/08/2013.
- Sapkota, A.; Sapkota, A. R.; Kucharski, M.; Burke, J.; Mckenzie, S.; Aquaculture practices and potencial human health risks: Current knowledge and future priorities. *Environment International*. v 34, p. 1215-1226, 2008.

CAPITULO I

Ensuring Food Safety in Developing and Developed Countries: Aspects associated to the use of veterinary drugs in fish farming in Brazil

Manuscrito a ser publicado como capítulo da *Encyclopedia of Food Safety*, Elsevier.

Summary

Food safety is an essential public health issue for all countries, being microbiological and chemical contamination in foods a major cause of diseases. In addition to improving public health, effective food safety systems are also vital to maintain consumer confidence in the food system and to provide a sound regulatory foundation for domestic and international trade in foods, which supports economic development. In addition to the growing concern over food safety, there has also been an increase in consumer preference for healthier food. In this respect, in search of a healthier diet with appropriate nutritional profile, demand for fish consumption is increasing progressively worldwide. In Brazil, fish farming is experiencing the higher growth among the production sectors of food of animal origin. Nonetheless, antimicrobial agents are widely used in fish farming, and few data on the type and amount of veterinary drugs used are available. In this chapter, aspects of risk assessment related to veterinary drug are presented. In particular, aspects associated to the current status on the use of veterinary drugs in fish farming, with emphasis in Brazil, will be addressed.

Keywords: food safety, risk analysis, risk assessment, fish farming, veterinary drugs, antimicrobials.

Introduction

Food safety is a public health issue, being the microbiological and chemical contamination of food important causes of diseases. In addition to improving public health, effective food safety systems are also essential to maintain consumer confidence in the food system, as well as to provide a sound basis for regulating the domestic and international trade of food, which serves to support economic development (FAO/WHO, 1991).

It is worth mentioning that food safety is the responsibility of everyone involved in the food chain. However, governments are responsible for providing an institutional and regulatory environment for the control of food. In this regard, the developed countries have well-defined procedures for assessing, managing and communicating risks related to food safety, from which best practices can be derived aiming to food safety (Barlow et al. 2002). On the other hand, developing countries are taking steps to improve and strengthen their food safety systems, based mainly on the guidelines of the Codex Alimentarius Commission (CAC) (FAO/WHO, 2005a; FAO/WHO, 2006b; Hanak et al. 2000). Furthermore, the Codex standards for food safety are recognized by the World Trade Organization (WTO) on the Application of the Sanitary and Phytosanitary Measures (SPS Agreement) and the Agreement on Technical Barriers to Trade (TBT Agreement). Thus, adopting Codex international standards as a basis for national regulations, which it is recommended, helps to harmonize the global application of food safety measures.

The CAC has as support of its decisions the principles of risk assessment (FAO 2000, FAO/WHO 2008). The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the World Health Organization (WHO) has played a leadership role in the development of risk analysis in food safety, which has demonstrated its capacity to improve the processes of decision making regarding food safety and the development of improvements in public health. Nevertheless, it should be mentioned that the paradigm of risk analysis is only part of an effective food safety system (FAO/WHO, 2005b). Other aspects that must be considered include:

- Food safety policies
- Food legislation (food law, regulations and standards)
- Food inspection

- Laboratory analysis
- Epidemiological surveillance of food-borne diseases
- Monitoring systems information
- Education
- Communication

In addition to the growing concern over food safety, there has also been an increase in consumer preference for healthier food (FAO, 2012). At this respect, in search of a healthier diet with appropriate nutritional profile, demand for fish consumption is increasing progressively worldwide. Therefore, nowadays an area of great interest in the production of food of animal origin is fish farming, which had experienced significant development since the 1990s. Approximately 40% of the world fish production comes from fish farming and most intensive production systems of fish are established in Asian countries. In these countries, antimicrobials are widely used in aquaculture, and few data on the type and quantity of veterinary drugs used are available. In addition, regulations on the use of antimicrobial agents in this sector are limited or do not exist in developing countries that have high activity in aquaculture. Thus, different authors have warned about the potential risk to human health from the use of veterinary drugs in this sector (Serrano, 2005; Torres et. al., 2010).

Complicating factors in the practice of aquaculture are the substantial differences between developed and developing countries, making it difficult to generalize findings and information taking into account the two groups. Moreover, while most of the global aquaculture production is in developing countries, the limited data currently available regarding the impact of fish farming in food and environmental safety are generated by developed countries (Sapkota, 2008).

In this chapter, aspects of risk assessment related to veterinary drug are presented. In particular, aspects associated to the current status on the use of veterinary drugs in fish farming, with emphasis in Brazil, will be addressed.

Risk assessment

As defined by the CAC, risk assessment is a component of the risk analysis paradigm, which is a process that allows information about the dangers in foods could be directly related to the data on the risk to human health. In this regards, risk analysis is a process consisting of three components: assessment, management and communication of risk (FAO/WHO, 1995; FAO/WHO, 2005b) (Figure 1).

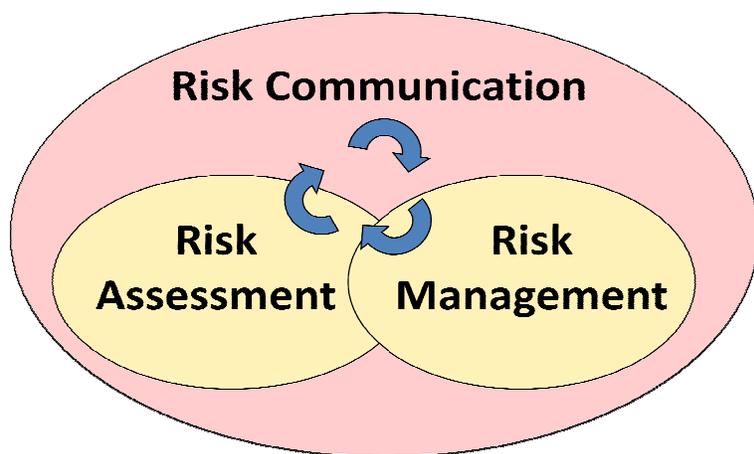


Figure 1. Components of risk analysis (FAO/WHO, 1997)

Risk assessment is the stage in which toxicological data available are evaluated to assess the safety of chemicals in food. Known or potential adverse effects resulting from human exposure to food borne hazards are scientifically evaluated. Thus, risk assessment provides the scientific basis for the decisions that may be taken in the stage of risk management necessary to protect human health, and takes into consideration all relevant scientific data (in the case of veterinary drug residues in foods include toxicological, pharmacological and microbiological data), as well as identifies the uncertainties inherent to the food safety evaluation. It consists of four steps: risk assessment, risk management and risk communication (Figure 2) (FAO/WHO, 1995; FAO/WHO, 2005b).

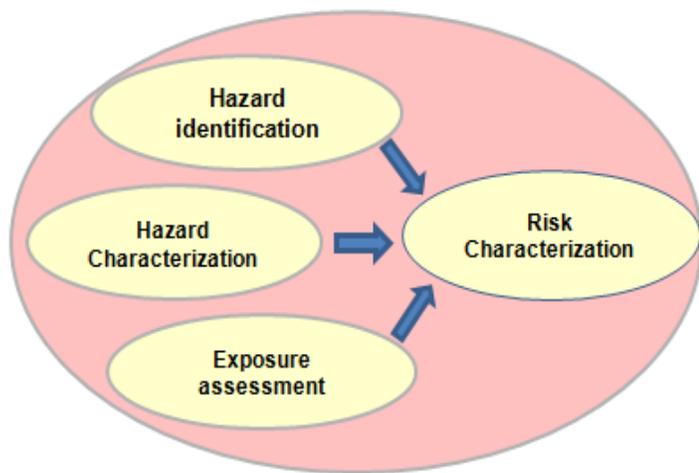


Figure 2. Steps of risk assessment (FAO/WHO, 1997)

The assessment of risk to human health resulting from exposure to veterinary drug residues in foods is part of the central activity performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (FAO/WHO, 1999). As a result of the evaluation of all relevant data available to the Committee, JECFA set health-based guidance values, such as the Acceptable Daily Intake (ADI), which is a level of exposure to a substance considered to be "without appreciable health risk". The setting of this parameter provides quantitative information of risk assessment used for risk management (IPCS, 2009a). ADI is defined as the amount of a substance, expressed in mg/kg body weight and as a range of zero to an upper limit, which may be ingested daily even a lifetime, without damage to human health, based on toxicological data available at the time of the evaluation (Vettorazzi, 2001).

Also, to protect the consumers against the possible risks associated to the presence of veterinary drugs residues in products of animal origin, maximum residue limits (MRLs) are established to ensure the quality and safety of consumer products. Residues of veterinary drugs include the parent compounds and/or their metabolites in any edible portion of the animal product, and include residues of associated impurities of the veterinary drug concerned.

MRL for Veterinary Drugs is defined by CAC as the maximum concentration of residue resulting from the use of a veterinary drug (expressed in mg/kg or µg/kg on a fresh weight basis) that is recommended by the CAC to be legally permitted or recognized as

acceptable in or on a food (CAC, 2012). MRLs are established for all veterinary drugs approved for use in animals intended to produce foods that when ingested by humans poses no health risks, and they are differentiated between animal species and tissues. (JECFA, 2007)

The MRL is based on the type and amount of residue considered to be without any toxicological, pharmacological or microbiological hazard for human health as expressed by the ADI, or on the basis of a temporary ADI that utilizes an additional uncertainty factor. It also takes into account other relevant public health risks as well as food technological aspects and estimated food intakes (Vettorazzi, 2001). When establishing an MRL, consideration is also given to residues that occur in food of plant origin and/or the environment. Furthermore, the MRL may be reduced to be consistent with good practices in the use of veterinary drugs (GPVD) and to the extent that practical analytical methods are available. GPVD is the official recommended or authorized usage including withdrawal periods, approved by national authorities, of veterinary drugs under practical conditions (FAO/WHO 2006a).

Although MRLs are linked to the ADI there is some flexibility to recommend MRLs depending on factors such as consumption, veterinary use practices and availability of suitable analytical methods for determining residues in food animal tissues. JECFA has devoted a significant effort to analytical methods performance because of the strong role it has in recommending MRLs. Therefore, recommended MRLs may be reduced to more conservative values than full use of the ADI (FAO/WHO 2006a).

Regarding the impact on human health, the intake of veterinary drug residues above the limit that is considered safe is an important public health issue because it can cause possible adverse effects, such as allergies and problems with the human intestinal flora. (FAO, 2010; FAO/OIE/WHO, 2006; Lunestad, 1992). Thus, organizations such as the Codex Alimentarius and the European Medicines Agency (EMA) regulate the use of these substances in animal production.

Health-based guidance values

Health-based guidance values (ADI) arise from the dose-response evaluation for the most relevant adverse effect of concern (*endpoint*) on the more sensible specie in the pre-clinical studies conducted to determine the potential dangerous of a substance. The studies are mainly conducted in laboratory animals, and should be adequate to allow for determining a reference point for hazard characterization, also known as point of departure (POD), such as a no-observed-adverse-effect level (NOAEL: the highest concentration of a toxicant expressed as mg/kg body weight/day, which does not cause dysfunctions in animals) or, sometimes, the LOAEL (lowest observed adverse effect level) or a Benchmark dose (BMD - a dose that produces a low but measurable adverse response). For veterinary drugs risk assessment the POD is derived from the toxicological, pharmacological and microbiological data available at the time of the compound evaluation, and ADI values are only established for substances that produce adverse effects that exhibit a threshold of toxicity. (IPCS, 2009a)

When calculating a health-based guidance value (ADI) an "uncertainty factor" is applied to the POD, in order to provide a conservative margin of safety due to uncertainties inherent in the extrapolation of toxicity data obtained with experimental animals for potential effects on humans, and due to the variability among humans. In the derivation of "uncertainty factors" based on data, instead of using standard factors, the concept of adjustment factors specific to a chemical has been introduced to allow, when possible, the use of specific data on species differences, or human variability, in toxicokinetics or toxicodynamic (Renwick, 2003; IPCS, 1994; IPCS, 2009a).

In setting the ADI of a veterinary drug, the toxicity of the parent compound and its major biotransformation products are considered. If a veterinary drug affects the human intestinal microflora in exposures below those that cause toxicological effect, then this effect (*endpoint*) is used as the basis for the establishment of the ADI (Vettorazzi, 2001).

Risk Characterization

In the risk characterization of veterinary drugs, the ADI values are compared with the estimated or determined human exposure. This stage of the risk assessment integrates information from hazard characterization and exposure assessment.

Where exposures exceeds the ADI values, by itself does not allow to infer the extent of the risk to those individuals exposed to these higher levels, since the ADI values incorporate “uncertainty factors”. An exposure that occasionally exceed the ADI value do not necessarily imply that adverse health effects will occur in humans (IPCS, 1987; IPCS, 2009a). The risk characterization shall consider the uncertainty and the variability. Uncertainty refers to the limitations of the information available to the risk assessor about the data and models used. The variability reflects the inherent biological heterogeneity, either in exposure or in response. The uncertainty can be reduced when the quantity or quality of the information is improved. The characterization of exposure variability via diet may be improved by better information, but the variability cannot be eliminated.

It should be emphasized that data on exposure to veterinary drug residues in food intended for human consumption are needed to characterize the risk that these compounds offer to human health. Nonetheless, in the case of fish and fish derivatives available to the consumers such data are not available in Brazil. In particular, data related to fish from “fish and pay” places.

Analytical Methods

The development of an analytical method for the determination of veterinary pharmaceutical residues in foods and biological matrices is essential to ensure that products are safe for consumer health. Thus, to guarantee the attainment of adequate results, the method must go through a procedure called analytical validation, which aims to evaluate and verify whether the results are suitable for the intended analysis (Paschoal et al. 2008). The specific MRLs for each target analyte must be taken into account in establishing the protocol for validation of the analytical method to be used in determining these residues in any matrix.

In cases of prohibited or unauthorized substances without MRL standards, the European Community established the Minimum Required Performance Limits (MRPLs), which is recognized as the minimum amount of a substance(s) present in a sample to be detected and confirmed by a determined analytical method (EC, 2002).

Validated analytical methods are also necessary for determining the concentration of a veterinary drug, and its biotransformation products, in pharmacokinetic and toxicokinetic studies. (IPCS, 1987; IPCS, 1990; IPCS, 2009a; Paschoal et al. 2008)

When necessary the form of application and distribution of residues that results from each application mode of a veterinary drug should be determined. In the case of veterinary drugs the depletion of residues in each species should be studied in the edible tissue, as well as a consequence of processing of foods of animal origin (FAO/WHO, 1985; IPCS, 2009a).

Data generated in Brazil about the development and validation of analytical method for the determination of veterinary drug residues in foods is seldom available. Nonetheless, a special issue of the journal Food Additives and Contaminants (FAC) was dedicated to Brazil and to the strategies implemented by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA), to tackle chemical food safety issues. This (FAC) issue features a selection of papers arising mainly from work conducted within laboratories belonging to MAPA. The papers deal with the determination of chemicals, such as heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons, phytosanitary products, mycotoxins, veterinary drugs or

dyes that are introduced into foods either as a result of their occurrence in the environment, natural infection by fungi, or other human activities (MAPA, 2012).

In Table 1 it is presented a list of papers related to work conducted in Brazil, associated to the development and validation of analytical method for the determination of antimicrobials residues in fish and determination of the withdrawal period under Brazilian environmental conditions. Although the commercially available samples have not shown a positive result for the presence of the studied compounds, the number of samples analyzed was too low to draw a conclusion about the use or not of antimicrobials in fish farming in Brazil.

Fish farming

China is the largest fish producer in the world, followed by Indonesia, India and Peru. Nevertheless, Brazil has a significant natural potential for aquaculture development. It has 7,367 km of coastline and 9 million hectares in water and hydroelectric reservoirs; the climate is predominantly tropical, which favors the production of several aquatic species, and concentrates 13.8% of the world's available surface freshwater. Brazil also has a significant extraction and industrial processing infrastructure, with fishing plants that are qualified according to the HACCP concept (Hazard Analysis and Critical Control Points). Thus, Brazil has the potential to become the largest fish producer in the world (Ostrensky et al. 2008).

In Brazil, aquaculture presents the highest growth among producers of food of animal origin. According to FAO and the Brazilian Ministry of Fisheries and Aquaculture (MPA), in 2010 Brazil occupies the 3rd place in the America aquaculture producers and the Brazilian total annual aquaculture production was 479,399 t, increasing 31.2% and 15.3% in relation to the production from 2008 and 2009, respectively, and the continental fish production represented 82.3% of the total production, compared to 81.2% in 2009, and 77.2% in 2008. In contrast, the marine aquaculture decreased compared with the previous years (Table 2) (FAO 2012, MPA, 2012).

Table 1. Work conducted in Brazil related to the development and validation of analytical method for the determination of veterinary drug residues in fish and determination of the withdrawal period under Brazilian environmental conditions

Title	Comments	References
Depletion study and estimation of the withdrawal period for enrofloxacin in pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	The results allowed the estimation of a half-life for ENR of 2.75 days and a withdrawal period of 23 days. The results obtained in this study are important for the farming of pacu in tropical regions	Paschoal et al. 2013
Determination and confirmation of chloramphenicol in honey, fish and prawns by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with minimum sample preparation: validation according to 2002/657/EC Directive	The method is suitable for the routine analysis in the National Residues and Contaminants Control Plan	Barreto et al. 2012
Validation of an LC-MS/MS method for malachite green (MG), leucomalachite green (LMG), crystal violet (CV) and leucocrystal violet (LCV) residues in fish and shrimp	The findings demonstrate the suitability of the method to detect simultaneously MG, CV and its metabolite (LMG and LCV) in fish and shrimp	Ascari et al. 2012
A Simple Method for the Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green Residues in Fish by a Modified QuEChERS Extraction and LC/MS/MS	Method attends the EC validation guide (EC 2002) which establishes that must attain, at least, a minimum required performance limit of 2 ng/g. Tilapia samples (n = 20) commercialized in Campinas, SP, Brazil were analyzed. None of them presented detectable levels of MG or LMG residues.	Hashimoto et al. 2012
Depletion study and estimation of the withdrawal period for oxytetracycline in tilapia cultured in Brazil	The elimination half-life for OTC in tilapia fillet and the withdrawal period were 1.65 and 6 days, respectively. Even though the study was carried out in the winter under practical conditions where water temperature varied, the results are similar to those obtained under controlled temperature.	Paschoal et al. 2012
A high-throughput method for determining chloramphenicol residues in poultry, egg, shrimp, fish, swine and bovine using LC-ESI-MS-MS	The advantages of the presented method include the short time to accomplish the analysis, the extraction procedure is very effective, simple and fast, with no further cleanup step. The method was sufficiently efficient for routine quality control operations. None of the fish samples analyzed (n=16) presented levels of CAP above the LOQ (0.1 ng/g).	Siquiera et al. 2009
Determination of quinolone residues in tilapias (<i>Oreochromis niloticus</i>) by HPLC-FLD and LC-MS/MS QToF	The LOQ was below the MRL established by JECFA, which indicates that the method is appropriate for the determination of quinolones in fish fillet.	Paschoal et al. 2009a
Quantitation and identity confirmation of quinolones residues in fish fillets by LC-ESI-MS/MS QToF	The method is suitable for the determination of quinolone residues in fish fillets and the QToF technique made it possible to obtain m/z ratios with less than 10 ppm of error for each analyte.	Paschoal et al. 2009b

LOQ = limit of quantification; MRL = maximum residue limit; JECFA = FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives

Table 2. Brazilian annual production (tons) of continental and marine aquaculture from 2008 to 2010.

Production	2008		2009		2010	
	(t)	(%)	(t)	(%)	(t)	(%)
Continental	282,008	77,2	337,352	81.2	394.340	82.3
Marine	83,358	22,8	78,296	18.8	85.058	17.7
Total	365,366		415.648		479.398	

Source: MPA, 2012

The FAO recommends the consumption of fish due to its outstanding quality as a source of animal protein. In 2008, the per capita world consumption was 17.1 kg/year, with a projection of 22.5 kg/year by 2030, which represents more than 100 million tons/year. In 2010, according to data provided by the MPA (2012), the per capita consumption of fish in Brazil was 9.75 kg/year, an increase of 8% over the previous year. Thus, Brazil has an excellent opportunity for the expansion of its fish farming.

Brazilian aquaculture is based mainly on semi-intensive production regimes and most fish culture is done in excavated ponds. The larvae and fingerlings are usually stocked in the ponds and feed during the entire cultivation period. It is also common to use fish cages installed in reservoirs and big ponds. According to MPA (2012), tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the most cultivated species in Brazilian continental fish farming (42.61%), followed by Chinese and common carp (*C. carpio*, *C. idella*, *Hypophthalmichthys molitrix* and *C. nobilis*) (25.93%); both species are considered exotic. Moreover, among the native species, tambaqui (*Colossoma macropomum*) (14.89%), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (5.82%) and tambacu hybrid (*Piaractus mesopotamicus male* x *Colossoma macropomum female*) (5.93%) are becoming prominent (Diegues, 2006; Ostrensky et al. 2008).

The most common diseases affecting fish farming are caused by facultative pathogens. These diseases are especially common in fish submitted to chronic stress. The major causes of stress are directly related to inadequate handling practices, poor water quality and low quality feeds that do not meet the nutritional requirements of the different species of fish. Thus, low quality feeds increase the chances of diseases occurring and high

mortality rates. The use of high fish densities in cages is another factor of stress in such systems and facilitates the spread of pathogens, thus producing high mortality levels. (Ostrensky et al. 2008). The degree of stress resulting from these conditions is characterized by modifications in the biochemical, physiological and behavioral mechanisms, with increase in the susceptibility to infectious processes caused by opportunistic pathogens like viruses, bacteria, fungi and parasites (Santos, 2007). The bacterial diseases stand out for being identified as the main factors limiting productivity, with the most common including columnaris (or gill necrosis), mobile septicaemia, vibrio, streptococcal (spiral swimming disease), edwardsiellosis and visceral granuloma. (Kubitza 2005a,b; Ranzani-Paiva et al. 1997).

Among the environmental issues, it is important to consider the following factors: the decrease in dissolved oxygen levels; increasing levels of carbon dioxide (CO₂), ammonia (NH₃) and nitrite (NO₂); sudden changes in temperature; the excessive accumulation of organic material; and other physical-chemical changes in the water. Another important factor to consider is the quick transportation of the fishes, which facilitates the spread of disease when purchasing care and quarantine guidelines are not respected (Pavanelli et al. 2002; Rotta and Queiroz, 2003).

Few studies had been carried out in Brazil with the objective of testing the efficiency and secondary effects of drugs used for the treatment of fish diseases, especially for fish produced in intensive culture systems (Pavanelli et al. 2002; Pizzolatti 2000). Furthermore, Souza (2003) affirmed that the indiscriminate use of chemical products to control parasites in fish culture systems is an issue of great concern, conditions that still persist in the country. As a matter of fact, in Brazil little data is available on the monitoring of veterinary drug residues in fish and fish products. In 2006, a study was conducted based on the application of questionnaires to fish farmers in the Mogi-Guaçu (SP) hydrographic basin, and the results obtained showed that 13 out of 84 fish farmers used malachite green on their properties for prophylaxis and/or disease treatment. Amongst the other compounds mentioned, only calcium oxide (lime), pesticides (organophosphates, benzoylphenylurea, carbamates and pyrethroids) and common salt, presented a higher frequency of use when compared to malachite green (Santos, 2007). Thus, this study indicates that fish farming

therapy for the treatment of disease, control and prevention of infection to increase production efficiency is conducted out of conformity, and that good veterinary practices are not followed.

Use of veterinary drugs in fish farming

Inevitably, diseases are present in all animal operations, and fish farming is no exception. All intensive animal production systems are favourable environments for the spread of diseases due to the higher population density of animals, with the aggravating factor that in fish farming the aquatic environment favours the proliferation of pathogens. The intensification of this activity contributes to the spread of disease, which is linked to inadequate management and poor environmental conditions in fish farming (Pavanelli et al. 2002; Roberts and Bullock, 1980; Rotta and Queiroz 2003; Schalch et al. 2005).

In fish farming systems the use of veterinary drugs, such as antibiotics, could be necessary under certain circumstances. However, there is great concern in the world about the indiscriminate use of antimicrobials in the livestock industry, especially regarding the issue of antimicrobial resistance and the potential impact on the animal production system and human and environmental health (OIE 2003; WHO 1998). In the animal production system, antimicrobial resistance can decrease the efficiency of veterinary drugs, thereby increasing the risk of economic loss. With respect to human health, several studies have shown that the use of antimicrobials in aquaculture generates the appearance of resistant bacteria, and there is epidemiological and molecular evidence indicating that the genes that mediate this resistance can be transmitted from aquatic bacteria to bacteria capable of producing infections in humans and land animals (Cabello 2004; Serrano, 2005; Sørum and L'Abée-Lund 2002; Sørum 1998).

In fish farming, veterinary drugs are used basically for the following purposes: therapeutic (the administration of medication to treat sick animals), and metaphylactic (the use of mass medication to eliminate or minimize an expected outbreak of a disease). In Brazil, due to the lack of alternative veterinary drugs approved for use, associated with the lack of scientific information about alternative treatments to control fish diseases, and the high cost of the available drugs, there is the suspicion that fish farmers, and in particular “fish and pay” locals, makes irregular use of veterinary drugs approved for other animal

species, or even the use of illicit substances (Carneiro et al. 2005; FAO 2010; Hashimoto et al. 2011; Hashimoto et al. 2012; MPA 2012). The producers attempt is to avoid economic losses. But, the improper and uncontrolled use of these products, increase the possibility of the presence of residues higher than the MRL of the product, the risk of residues affecting the fish farming production, the environment, and consequently, human health. These residues are directly related to the issue of antimicrobial resistance. (FAO 1997; FAO/SEAFDEC/CIDA 2000; OIE 2003; WHO 1998).

The development of microbial resistance is dependent on various circumstances. It is a proven fact that the bacterial strain that colonizes fish intestines may be more susceptible or resistant to antimicrobials such as the oxytetracycline and the quinolones (flumequine and oxolinic acid) depending on the aquatic environment (fresh or salt water) (FAO/RCAAP/OMS, 1999).

Regarding the risk to human health through the development of microbial resistance in aquaculture, the FAO/OIE/WHO (2006) highlights two important aspects: (1) The development of antimicrobial resistance acquired by aquatic bacteria, which can be regarded as a direct spread to humans; (2) The development of microbial resistance, acquired in aquatic bacteria through bacteria that act as a reservoir of resistance genes that are disseminated to the pathogenic bacteria and then humans. This is considered as indirect spread to humans, caused by horizontal gene transfer.

Currently, there is evidence to indicate that the genes that mediate this resistance can be transmitted from aquatic bacteria to bacteria capable of producing infections in humans and land animals. This shows that there are no boundaries with respect to the flow of microbial resistance genes and that this phenomenon is global because the use of antimicrobials in one environment will impact other environments that are seemingly distant (Cabello, 2004; Sorum, 2009)

It must be mentioned that the use of antibiotics in aquaculture depends on local regulations, which varies widely between different countries. As a result of a growing awareness that antibiotics should be used more carefully, there is a trend toward more restrictive regulations of these compounds in the aquaculture sector, and in the presence of antibiotic residues in food products originating from aquaculture (Serrano, 2005). In some

developed countries the regulations on the use of antibiotics is severe and only few compounds are licensed for use in aquaculture. However, a large portion of the global aquaculture production is in developing countries that do not have, or has a limited regulation regarding the use of veterinary drugs.

Regulatory aspects of veterinary drugs

The establishment and application MRL standards for veterinary drugs used in animal production is indispensable, and currently this is done by developed countries in relation to veterinary drugs used in fish farming. Regulations not only determine the types of antimicrobial agents that can be used, but they also specify the species for which it is intended, the diagnosis, the dosage and duration of treatment, as well as the interruption period to be observed between the last dosing and the slaughter (withdrawal period) when the veterinary drug (i.e. antimicrobial) is to be used as a therapeutic agent. Compliance with these conditions and regulations ensures that residues are below the established MRL standards, and the risk of pathogenic bacteria developing resistance is negligible or at least acceptable. In the developed countries, the majority of approved antimicrobials are available by prescription only and under the supervision of a qualified professional (FAO, 2002).

On the other hand, developing countries adopt the CAC recommendations to establish sanitary monitoring measures. As a member of Codex, the Brazilian Ministry of Health adheres to the MRL standards for veterinary drugs established by CAC for food of animal origin. Nevertheless, in Brazil part of the difficulties related to preventing and treating fish diseases is the deficiency of specific legislation and approved veterinary drugs for use by fish farmers. Currently there are regulated only 3 veterinary drugs: 2 Antimicrobials (florfenicol and oxytetracycline) and a parasiticide based on trichlorfon (Figure 3).

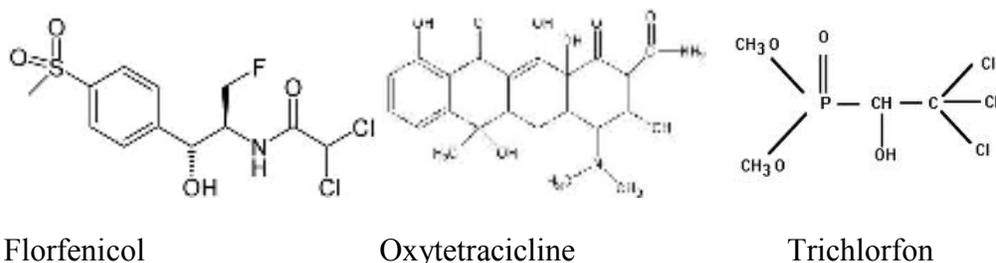


Figure 3. Structures of veterinary drugs officially approves in Brazil for use in fish farming

For inspection purposes, in case of MRLs are not set by the CAC or by the Ministry of Health, MAPA use those established in the Southern Common Market (MERCOSUR), or those adopted by the Commission of the European Union or by the US FDA. In this regards, MAPA created the National Plan for Control of Residues and Contaminants (PNCRC). PNCRC aims to verify the presence in foods of residues of chemical compounds potentially hazardous to consumer health, such as pesticides and veterinary drugs residues, environmental contaminants and inorganic contaminants. This plan is intended for products of vegetal (PNCRC/Vegetal) and animal origin (PNCRC/Animal). One of the food matrix evaluated under the PNCRC/Animal is fish produced by fish farmers (PNCRC/fish) (MAPA, 1999).

To evaluate the no compliance to the LMR of veterinary drugs and the use of prohibited compounds are part of the PNCRC/Animal monitoring subprogram. Thus, PNCRC/Animal constitutes a tool of "risk management" with the primary objective of promoting quality assurance on the production system of foods of animal origin along the supply chains. One of the concepts adopted by the PNCRC is the "equivalence of systems". That is, the products exported by Brazil must meet the requirements of quality and safety practiced by importing markets, according to the precepts of the SPS (Sanitary and Phytosanitary Measures) and CAC parameters, in order to provide assurance and mutual recognition (MAPA 2013a).

In 2007 MAPA started to publish the results obtained from the analyses conducted through the PNCRC/fish. All data reported indicate residues absence of the determined antimicrobials, or of the food dye malachite green, in the analyzed samples (MAPA 2007; 2008; 2009; 2010; 2011; 2013b). However, it must be mentioned that the samples analyzed under the PNCRC/Animal are from establishments which have Federal Inspection Service

(SIF). Nonetheless, a popular fish production system in Brazil, not only as a fish supply but for recreation purposes, is the so called “fish and pay”. Due to the stress condition of the fish produced at this system, and the fact that they are not inspected by SIF, there is the suspicion of no conformity on the use of veterinary drugs, in particular antimicrobials, at those systems. Nevertheless, no data is available related to veterinary drug residues on fish from “fish and pay” places.

In 2003, the Brazilian National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA) created the National Program for the Analysis of Veterinary Drug Residues in Foods of Animal Origin (PAMVet). This program contemplates sample collection actions on the retail market and the determination of residues, with the objective of evaluating the exposure of the consumer to veterinary drug through the consumption of foods of animal origin. In the initial schedule of the program, the analyses of fish samples were planned for the fourth year of activity after its implementation (ANVISA, 2003). However, those analyses have not been implemented yet (ANVISA, 2006).

Unfortunately, in Brazil surveillance and risk management regarding the presence of contaminant residues in foods have occurred primarily as a result of non compliance with the requirements of the international market, leaving in the background the protection of its population health (Spisso et al. 2009).

Final Considerations

The Codex standards are established based on scientific criteria grounded in risk analysis, as an important part of the food safety system. JECFA, Codex advisory committee, has played a leading role in the development of this paradigm. The adoption of Codex standards as a basis for national regulations helps to harmonize the global application of food safety measures. Thus, it is recommended that developing countries continue to harmonize their laws based on Codex standards and to adopt the criteria of risk analysis. However, exposure data to chemical substances present in food (i.e., veterinary drug residues in fish) is a need to characterize the risk that these substances provide to population health. Though, in many situations, developing countries lack data on the quality of food products, either due to lack of appropriate analytical methods, or to lack of

qualified technician to perform the analyzes, resulting in deficiency or lack of key data in the risk assessment .

On the other hand, aquaculture is the fastest growing food production system in the world, and Brazil has a high potential for fish production. Under some circumstances, like other agribusiness activities, the use of veterinary drugs is a tool to increase the efficiency in fish farming. However, Brazil faces a shortage of veterinary drugs officially approved to be used by fish farmers in this activity. Thus, there is the suspicion that veterinary drugs approved for other species, and even illicit substances are being used in fish farming, in particular in “fish and pay” places. Nevertheless, in Brazil there are 2 programs intended to the monitoring of veterinary drugs residues in foods; the PNCRC (MAPA 2013a) and the PAMVet (ANVISA 2003) that belong to MAPA and the Ministry of Health, respectively. Only PNCRC is currently monitoring veterinary drugs residues in fish (PNCRC/fish).

Veterinary drugs ought to be administered in a responsible and prudent manner, always respecting the good veterinary practices, in order to avoid affecting the efficiency of fish production and the establishment of exportation barriers, as well as the risk to human and environmental health the exposure to those substances may cause. In particular to manage the issue of antimicrobial resistance, which is currently discussed taking into consideration the impacts on aquaculture production, human and environmental health. For this reason, monitoring of the presence of veterinary drug residues in fish products is of fundamental importance to protect consumer’s health, and also for the development of the fish farming activity. In this regard, the analytical method is a vitally important tool to ensure that the products are presented in conformity with the food law.

References

- ANVISA. (2003). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet, Brasília, 2003. Retrieved from <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>.
- ANVISA. (2006). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal- PAMVet. Relatório 2004/2005 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo. 2006. Retrieved from <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/index.htm>.
- Ascari, J., Dracz, S., Santos, F. A., Lima, J. A., Diniz, M. H. G. & Vargas, E. A. (2012). Validation of an LC-MS/MS method for malachite green (MG), leucomalachite green (LMG), crystal violet (CV) and leucocrystal violet (LCV) residues in fish and shrimp. *Food Additives and Contaminants*, 29(4), 602–608. doi: 10.1080/19440049.2011.653695.
- Barlow, S., Dybing, E., Edler, L., Eisenbrand, G., Kroes, R. & Van den Brandt, P. (Eds). (2002). Food safety in Europe (FOSIE): risk assessment of chemicals in food and diet. *Food Chemical Toxicology*, 40(2/3), 237–427.
- Barreto, F., Ribeiro, C., Hoff, R. B. & Costa, T. D. (2012). Determination and confirmation of chloramphenicol in honey, fish and prawns by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with minimum sample preparation: validation according to 2002/657/EC Directive. *Food Additives and Contaminants*, 29(4), 550–558. doi: 10.1080/19440049.2011.641160.
- Cabello, F. C. (2004). Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Revista Médica Chile* 132, 1001-1006. doi: 10.4067/S0034-98872004000800014
- CAC. (2012). Veterinary Drug Residues in Food: Glossary of Terms. Updated up to the 35th Session of the Codex Alimentarius Commission. Retrieved from <http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/reference/glossary.html>.

- Carneiro, P. C. F., Schorer, M., Mikos, J. D. (2005). Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparasita *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiá (*Rhamdia quelen*). Pesquisa Agropecuária Brasileira, 40(1), 99-102. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2005000100015>.
- Diegues, A. C. (2006). Para uma aquicultura sustentável do Brasil. NUPAUB – Núcleo de Apoio à Pesquisa sobre Populações Humanas e Áreas. Center for Research on Human Population and Wetlands in Brazil – USP, Article nº 3, São Paulo, Brazil. Retrieved from <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAE6KcAF/aquicultura-sustentavel-brasil#>.
- EC. (2002). European Commission 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Retrieved from http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=EN&numdoc=32002D0657&model=guichett.
- FAO. (1997). Towards safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture. GESAMP Reports and Studies No. 65, Roma. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/meeting/003/w6435e.htm>.
- FAO. (2000). Report of the conference on international food trade beyond 2000: science-based decisions, harmonization, equivalence and mutual recognition. FAO document ALICOM 99/25, 11–15 October 1999, Melbourne, Australia. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/meeting/X4015E.htm>.
- FAO. (2002). Estado mundial de la pesca y la acuicultura 2002. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma. Retrieved from <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/y7300s/y7300s00.pdf>.
- FAO. (2010). Estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s.pdf>.
- FAO. (2012). World Review of Fisheries and Aquaculture: Part 1. The State of World Fisheries and Aquaculture. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e01.pdf>.

- FAO/RCAAP/OMS. (1999). Grupo de Estudio Mixto FAO/RCAAP/OMS sobre Cuestiones de Inocuidad de los alimentos asociadas con los productos de la acuicultura. *OMS Serie de Informes Técnicos 883*, Ginebra, Suiza. Retrieved from <http://helid.digicollection.org/en/d/Jwho75s/>.
- FAO/OIE/WHO. (2006). Report of a Joint Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance, Korea, 2006, Retrieved from http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/aqua_jun06/en/index.html.
- FAO/SEAFDEC/CIDA. (2000). Use of chemicals in aquaculture in Asia. Proceedings of the meeting convened by SEAFDEC/AQD, FAO/UNDP and CIDA in Philippines, 20-22 May 1996. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/005/w3666e/W3666e06.htm>.
- FAO/WHO. (1985). Residues of veterinary drugs in foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Rome, 1984. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. FAO Food and Nutrition Paper, No. 32.
- FAO/WHO. (1991). Report of the FAO/WHO conference on food standards, chemicals in food and food trade, Rome, 18–27 March 1991. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO document ALICOM 91/22.
- FAO/WHO. (1995). Application of risk analysis to food standards issues. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, World Health Organization, Geneva, CH, 13–17 March 1995. (WHO/FNU/FOS/95.3). Retrieved from <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/march1995.pdf>.
- FAO/WHO. (1997). Food consumption and exposure assessment of chemicals. Report of an FAO/WHO Consultation, World Health Organization (WHO/FSF/FOS/97.5), Geneva, CH, 10–14 February 1997.
- FAO/WHO. (1999). JECFA/JMPR informal harmonization meeting, Rome, 1–2 February 1999. Retrieved from http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/99_JECFA/JEC-JMPR.pdf.
- FAO/WHO. (2005a). Enhancing participation in Codex Activities. An FAO/WHO training package. World Health Organization, Geneva, CH. Retrieved from <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/008/y5884e/y5884e00.pdf>.

- FAO/WHO. (2005b). Food Safety Risk Analysis. Part I. An Overview and Framework Manual. Rome, Italy. Retrieved from http://www.fsc.go.jp/sonota/foodsafety_riskanalysis.pdf.
- FAO/WHO. (2006a). Updating the Principles and Methods of Risk Assessment: MRLs for Pesticides and Veterinary Drugs. Rome, 2006. Retrieved from http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/DOWNLOAD/bilthoven_2005.pdf.
- FAO/WHO. (2006b). Food safety risk analysis: a guide for national food safety authorities. FAO Food and Nutrition Paper, No. 87. Retrieved from http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9789251056042_eng.pdf.
- FAO/WHO. (2008). Codex Alimentarius Commission procedural manual, 18th ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Codex Alimentarius Commission, Rome. Retrieved from ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_18e.pdf.
- Hanak, E., Boutrif, E., Fabre, P., Pineiro, M. (Eds). (2002). Food Safety Management in Developing Countries. Proceedings of the International Workshop CIRAD-FAO, 11-13 December 2000, Montpellier, France.
- Hashimoto, J. C., Paschoal, J. A. R., Queiroz, J. F., Reyes, F. G. R. (2011). Considerations on the Use of Malachite Green in Aquaculture and Analytical Aspects of Determining the Residues in Fish: A Review, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 20(3), 273-294. doi: 10.1080/10498850.2011.569643
- Hashimoto, J. C., Paschoal, J. A. R., Queiroz, S. C. N., Ferracini, V. L., Assalin, M. R., Reyes, F. G. R. (2012). A Simple Method for the Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green Residues in Fish by a Modified QuEChERS Extraction and LC/MS/MS. *Journal of AOAC International*, 95(3), 913-922. doi: <http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.11-140>.
- IPCS. (1987). Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria, No. 70. World Health Organization, Geneva, CH. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc70.htm>.

- IPCS. (1990). Principles for the toxicological assessment of pesticide residues in food. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria, No. 104. World Health Organization, Geneva, CH. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc104.htm>.
- IPCS. (1994). Assessing human health risks of chemicals: derivation of guidance values for health-based exposure limits. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria, No. 170. World Health Organization, Geneva, CH. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc170.htm>.
- IPCS. (2009a). Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria, No. 240. World Health Organization, Geneva, CH. Retrieved from <http://www.who.int/foodsafety/chem/principles/en/index.html>.
- JECFA. (2007). Joint Expert Committee on Food Additives. Retrieved from <http://jecfa.ilsa.org/section1.htm#1>.
- Kubitza, F. (2005a). Antecipando-se às doenças na tilapicultura. Revista Panorama da Aquicultura. 15(89): 15-23.
- Kubitza, F. (2005b). Tilápia em água salobra e salgada: uma boa alternativa de cultivo para estuários e viveiros litorâneos. Revista Panorama da Aquicultura. 15(88): 14-18.
- Lunestad, B. T. (1992). Fate and effects of antibacterial agents in aquatic environments. In: Michel, C. M. & Alderman, D. J. (Eds.). Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality. Office International de Epizooties, (pp. 152-161), Paris, France.
- MAPA. (1999). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne, Mel, Leite e Pescado. Instrução Normativa N° 42, de 20/12/1999. Anexo I. Retrieved from <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=11049>.
- MAPA. (2007). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa N° 8, de 30 de março de 2007. Retrieved from http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2008%202007.pdf.

- MAPA. (2008). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa Nº 9, de 10 de abril de 2008. Retrieved from: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2009%202008.pdf.
- MAPA. (2009). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa Nº 15, de 25 de Maio de 2009. Retrieved from http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2015%202009.pdf.
- MAPA. (2010). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa Nº 6, de 16 de Março de 2010. Retrieved from http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2006%202010.pdf.
- MAPA. (2011). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa Nº 6, de 25 de Fevereiro de 2011. Retrieved from http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2006%202011.pdf
- MAPA. (2012). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil – Laboratórios Nacionais Agropecuários: Methods of analysis for residue and contaminants in the food chain Food Additives and Contaminants 29(4), 481-703.
- MAPA. (2013a). What is PNCRC (National Plan for Control of Residues and Contaminants)? [cited 9 April 2013]. Retrieved from http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/P%C3%A1gina%20CRC%20ingl%C3%AAs.pdf.
- MAPA. (2013b). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa Nº 7, de 27 de março de 2013. Retrieved from http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/Instru%C3%A7%C3%A3o%20Normativa%207%20-%202013%20Resultados%20PNCRC%202012.pdf.
- MPA. (2012). Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2010. Brasília. Retrieved from http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%C3%ADstico%20MPA%202010.pdf.
- Ostrensky, A., Borghetti, J. R., Soto, D. (Eds.). (2008). Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer. Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca & Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). Brasília, Brazil. Retrieved from

- <http://projetopacu.com.br/public/paginas/202-livro-aquicultura-no-brasil-o-desafio-e-crescer.pdf>.
- OIE. (2003). Organização Internacional das Epizootias. Manual de Testes Diagnósticos para Animais Aquáticos. Francia. Retrieved from <http://www.oie.int/doc/ged/D6505.PDF>.
- Paschoal, J. A. R., Rath, S., Airoidi, F. P. S., Reyes, F. G. R. (2008). Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, 31(5), 1190-1198. doi: 10.1590/S0100-40422008000500048.
- Paschoal, J. A. R., Quesada, S. P., Gonçalves, L. U., Cyrino, J. E. P., Reyes, F. G. R. (2013). Depletion study and estimation of the withdrawal period for enrofloxacin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, [Epub ahead of print]. doi: 10.1111/jvp.12043.
- Paschoal, J. A. R., Bicudo, A. J. A., Cyrino, J. E. P., Reyes, F. G. R., Rath, S. (2012). Depletion study and estimation of the withdrawal period for oxytetracycline in tilapia cultured in Brazil. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 35(1), 90-96. doi: 10.1111/j.1365-2885.2011.01294.x.
- Paschoal, J. A. R., Reyes, F. G. R., Rath, S. (2009). Determination of quinolone residues in tilapias (*Oreochromis niloticus*) by HPLC-FLD and LC-MS/MS QToF. *Food additives and contaminants*, 26, 1331-1340. doi: 10.1080/02652030902822778.
- Paschoal J., Reyes, F. G. R., Rath, S. (2009). Quantitation and identity confirmation of quinolones residues in fish fillets by LC-ESI-MS/MS QToF. *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, 2213-2221. doi: 10.1007/s00216-009-2900-z.
- Pavanelli, G., Eiras, L., Takaemoto, R. (2002). Doenças em peixes: Profilaxia, diagnóstico e tratamento. 2nd. ed. Maringá, Eduem, Brazil.
- Pizzolatti, I. A. (2000). *Lernaea cyprinacea: Controle e prevenção em pisciculturas de águas interiores*. (Unpublished dissertation thesis). Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Brazil.
- Ranzani-Paiva, M. J. T., Ishikawa, C. M., Campos, B. E., Eiras, A. C. (1997). Hematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus*,

- from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira Zoologia*, 14, 329-339. doi: 10.1590/S0101-81751997000200007.
- Renwick, A. G., Barlow, S. M., Hertz-Picciotto, I., Boobis, A. R., Dybing, E., Edler, L., Eisenbrand, G., Grieg, J. B., Kleiner, J., Lambe, J., Müller, D. J. G., Smith, M. R., Tritscher, A., Tuijelaars, S., Van den Brandt, P. A., Walker, R., Kroes, R. (2003). Risk characterization of chemicals in food and diet. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1211–1271.
- Roberts, R. J., Bullock, A. M. (1980). The skin surface ecosystem of teleost fishes. *Proceedings of the Royal Society Edimburg*. n. 79, p. 87-91.
- Rotta, M. A., Queiroz, J. F. (2003). Boas práticas de manejo (BPMs) para a produção de peixes em tanques-redes. EMBRAPA Série Documentos, n. 47. Corumbá, MS, Brazil. Retrieved from <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/DOC47.pdf>
- Santos, R. L. (2007). O uso de praguicidas nas atividades aquícolas: destinos e efeitos após aplicações em tanques experimentais e avaliação nas pisciculturas e pesqueiros da bacia do rio Mogi-Guaçu. (Unpublished doctoral thesis). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brazil.
- Sapkota, A., Sapkota, A. R., Kucharski, M., Burke, J., McKenzie, S., Walker, P., Lawrence, R. (2008). Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. *Environment International*, 34, 1215-1226. doi: 10.1016/j.envint.2008.04.009.
- Schalch, S. H. C., Belo, M. A. A., Soares, V. E., Moraes, J. R. E., Moraes, F. R. (2005). Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. *Animal Science, Acta Scientiarum*, 27, 297-302. doi: 10.4025/actascianimsci.v27i2.1235.
- Serrano, P. H. (2005). Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. No. 469. Rome. Retrieved from <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0282e/a0282e00.pdf>.
- Siqueira, S. R. R., Donato, J. L., Nucci, G. D., Reyes, F. G. R. (2009). A high-throughput method for determining chloramphenicol residues in poultry, egg, shrimp, fish, swine

- and bovine using LC-ESI-MS-MS. *Journal of Separation Science*, 32, 4012–4019. doi: 10.1002/jssc.200900345.
- Sørum, H., L’Abee-Lund, T. (2002). Antibiotic resistance in food related bacteria, a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 43-56. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00241-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00241-6).
- Sørum, H. (1998). Mobile drug resistance genes among fish bacteria. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 106(84), 74-76. doi: 10.1111/j.1600-0463.1998.tb05652.x
- Souza, A. T. S. (2003). Certificação da qualidade de pescados. *Biológico*, 65(1/2), 11-13.
- Spisso, B. F., Nobrega, A. W. de; Marques, M. A. S. (2009). Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. *Ciência & Saúde Coletiva*, 14(6), 2091-2106. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232009000600016>.
- Torres, C., Moreno, M. A., Zarazaga, M. (2010). Prudent use of antimicrobial agents: Not just for humans. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(10), 669-671. doi: 10.1016/j.eimc.2010.09.001.
- Vettorazzi, G. (Ed). (2001). The ITIC International Dictionary of Toxicology. International Toxicology Information Centre. ITIC Press. Spain.
- WHO. (1998). World Health Organization. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Report of a WHO Meeting—Emerging and other communicable diseases, surveillance and control. Geneva, CH, June/1998. Retrieved from http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO EMC_ZDI_98.10.pdf.

CAPITULO II

Considerações sobre o uso de sulfonamidas na produção de alimentos de origem animal

Resumo

Desde os anos 1950, um amplo número de fármacos veterinários tem sido usado com o propósito de melhorar a saúde animal, assim como promotores de crescimento em sistemas intensivos de produção animal. Entretanto, o uso abusivo de antibióticos na criação de animais destinados a produção de alimentos para consumo humano resulta na presença destes compostos nos produtos finais, incluindo carne, peixe, leite e ovos. Os riscos à saúde humana, relacionados ao uso de antimicrobianos na produção de alimentos de origem animal, envolvem muitos problemas tais como o aumento do risco de desenvolver alergias em indivíduos com hipersensibilidade e o desenvolvimento da resistência bacteriana a antibióticos. Assim, em 2006, o uso de antibióticos como promotores de crescimento foi proibido pela Comissão Européia, para garantir a segurança humana e animal (Boscher, 2010). O objetivo desta revisão é tratar sobre o emprego das sulfonamidas na produção de alimento de origem animal e seus efeitos adversos, assim como sobre os aspectos regulatórios praticados no Brasil e no mundo com relação ao emprego de sulfonamidas na prática veterinária.

Palavras-chave: resíduo, sulfonamida, trimetoprim, UPLC-ESI-QToF MS

Abstract

Since the 1950s, a large number of veterinary drugs have been used in order to improve animal health. These drugs (antibiotics) have also been applied as growth promoters in intensive animal production systems. However, the overuse of antibiotics in livestock for the production of food for human consumption results in the presence of these compounds in the final products, including meat, fish, milk and eggs. Risks to public health, concerning the use of antibiotics in aquaculture, involve many problems such as increased risk of developing allergies in individuals with hypersensitivity and the development of bacteria resistant to antibiotics. Since 2006, the use of antimicrobial as growth promoters has been prohibited by the European Commission, to ensure the human and animal health safety and feed (Boscher, 2010). The aim of this review is to address the use of sulfonamides on the production of food of animal origin and its adverse effects, as well as on the regulatory aspects practiced in Brazil and the world with respect to the use of sulfonamides in veterinary practice.

Keywords: residue, sulfonamide, trimetoprim, UPLC-ESI-QToF MS

Introdução

Agentes antimicrobianos são amplamente utilizados na produção de alimentos de origem animal, no tratamento de doenças, controle e prevenção de infecções e como promotores de crescimento. A presença destes agentes em alimentos de origem animal, com valores acima do estabelecido pelo LMR, indica que as boas práticas veterinárias não foram respeitadas, contribuindo para o aumento da resistência bacteriana em humanos (Mamani, 2009; Nonaka, 2012).

O Brasil é um dos cinco maiores mercados veterinários do mundo, sendo que os antimicrobianos são empregados em criações animais de forma indiscriminada e sem fiscalização, seja seu uso na criação de peixes, pecuária ou animais domésticos (Sindan-BNDES, 2007; FAO, 2010).

Antimicrobianos podem estar presentes em produtos alimentícios de origem animal, seja pelo uso ilegal na alimentação animal ou contaminação cruzada involuntária. Portanto o monitoramento de resíduos de antimicrobianos na alimentação animal também é importante para controlar a contaminação no processo da cadeia alimentar que, potencialmente, pode resultar em efeitos nocivos à saúde de animais e consumidores, infringindo as boas práticas de produção (Boscher, 2010). O emprego sem controle viola as boas práticas veterinárias na produção de alimentos de origem animal.

Para proteção dos consumidores, foi estabelecido pelo CODEX, OMC, OIE e órgãos auxiliares (FAO, WHO), na Comunidade Européia, MERCOSUL, e também no Brasil pela ANVISA o Limite Máximo de Resíduos (LMR). Os planos de monitoramento são determinados para assegurar a observância do LMR, assim como prevenir a presença de substâncias proibidas em alimentos, o qual, no Brasil, é realizado pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). O LMR estabelecido para as sulfonamidas é de $100 \mu\text{gkg}^{-1}$ para a presença de cada fármaco nos tecidos comestíveis, ou para a soma de todos eles. Para o trimetoprim o LMR é de $50 \mu\text{gkg}^{-1}$ (MAPA, 2013; FAO, 2012). Ainda, com o intuito de diminuir o uso indiscriminado de antimicrobianos, no Brasil (MAPA, 2013) e na Comunidade Européia foi proibido o uso destes como aditivos alimentares e promotores de crescimento em ração para alimentação. Assim, para garantir a segurança humana e animal, os antimicrobianos agora possuem seu uso reservado estritamente para tratamento de doenças (Boscher, 2010; Cronly, 2010).

O objetivo desta revisão é tratar sobre o emprego das sulfonamidas na produção de alimentos de origem animal e seus efeitos adversos à saúde humana, assim como abordar os aspectos regulatórios praticados no Brasil e no mundo com relação ao emprego de sulfonamidas na prática veterinária.

Revisão bibliográfica

Sulfonamidas

Sulfonamidas pertencem a um importante grupo de antimicrobianos sintéticos que tem sido utilizado na medicina veterinária e humana por mais de 60 anos. Recentemente, esses fármacos tem sido extensivamente empregados na produção de alimentos de origem animal. Seus resíduos tem sido uma grande preocupação devido a possibilidade de risco à saúde humana, com o desenvolvimento de resistência bacteriana e reações adversas, tais como reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis. (Pecorelli, 2004).

As sulfonamidas tem sido largamente usadas, especialmente em bovinos, aves domésticas e suínos com o objetivo de melhorar o desempenho dos animais, reduzindo os custos de produção, uma vez que é praticamente impossível manter o ambiente produtivo isento de organismos patógenos. Assim, o uso de sulfonamidas tem sido uma excelente ferramenta para ajudar a alcançar altos níveis de produtividade, com maior crescimento, eficiência alimentar e com redução da mortalidade e morbidade (Nonaka, 2012).

Na aquicultura, grandes quantidades de antimicrobianos, entre eles as sulfonamidas são usados. Este uso ocorre frequentemente sem supervisão ou consulta adequada de um profissional qualificado (Samanidou, 2007). Prevenção e controle de doenças bacterianas em animais aquáticos são essenciais para minimizar o uso de antimicrobianos e evitar o impacto negativo da resistência antimicrobiana. A maioria das bactérias patógenas de peixe, tais como as *Aeromonas sp*, *Pseudomonas sp*, *Vibrio sp* é Gram-negativa. Estas bactérias estão geralmente envolvidas com doenças bacterianas tais como úlceras, septicemia hemorrágica causando um grande número de mortalidades (Samanidou, 2007). Uma das principais vantagens do uso das sulfonamidas é que ela é facilmente absorvida através das brânquias, sendo que a sua administração, por imersão, é factível e de particular vantagem para peixes juvenis (Park, 2012). Na Ásia é comum o uso de sulfonamidas para o combate da *vibriosis* causada pelo *Vibrio carchariae* e *V. alginolyticus*, sendo esta uma das

mais importantes enfermidades (Harikrishnan, 2011). Sulfonamidas (sulfadiazina) também tem sido usadas no combate de *Aeromonas* sp (Defoirdt, 2011). Além do seu uso na aquicultura elas são amplamente usadas no tratamento e prevenção de doenças em outros animais. No Japão, esse mesmo número de diferentes moléculas também tem sido utilizado na criação de peixes (Samanidou, 2007).

Em resposta ao aumento da ameaça à saúde pública, o desenvolvimento de métodos altamente sensíveis para determinação de sulfonamidas em várias matrizes de amostras tais como alimentos, tecidos animais, água e matrizes do meio ambiente é urgentemente necessário (Cheng, 2011).

Emprego das sulfonamidas no mercado mundial

Na Europa, as sulfonamidas são o segundo grupo de antimicrobianos mais utilizado na veterinária depois das tetraciclina. As sulfonamidas são usadas no tratamento de doenças humanas, porém mais comumente usadas em fazendas produtoras de animais, incluindo os peixes (Rodríguez, 2012).

Trimetoprim é outro antimicrobiano frequentemente coadministrado com sulfametoxazole para aumentar a potência do tratamento contra uma variedade de infecções bacterianas de forma sinérgica. Na Austrália, sulfametoxazole e trimetoprim estão entre os 50 fármacos mais usados (Le-Minh, 2012).

Como consequência do uso excessivo de substâncias antimicrobianas em animais, os resíduos destas substâncias podem chegar até os humanos através do consumo de alimentos de origem animal (Kantiani, 2010). Em 2006, a Comissão Europeia (*Commission Recommendation 2005/95/EC*) proibiu o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento (Cronly, 2010). Assim, para garantir a segurança humana e animal, os antimicrobianos agora possuem o uso reservado estritamente para tratamento de doenças (Boscher, 2010). O seu uso tem criado problemas devido ao seu efeito tóxico, resistência, resíduo acumulativo e possíveis consequências à saúde pública e meio ambiente (Harikrishnan, 2011).

Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal - Sidan, mais de 85% das vendas globais da indústria de saúde animal estão concentradas em apenas

15 países. Destacam-se os Estados Unidos (EUA), que compõem cerca de 46% do mercado global, Europa com 33% e outros países com 21% (Sindan, 2012).

A *Animal Pharm* afirmou que o crescimento do mercado global de saúde animal foi de 4,5% ao ano durante a segunda metade da década passada, alcançando vendas de US\$ 21,7 bilhões em 2010. As vendas da China cresceram, nesse mesmo período, em 8%, enquanto o mercado brasileiro cresceu 6%. A expansão do mercado de saúde animal pode ser atribuída, principalmente, a três fatores: continuidade da ameaça de doenças animais, aumento do interesse da população sobre a segurança alimentar e, conseqüentemente, aumento do rigor regulatório e, finalmente, crescimento da população de animais de companhia (Sindan-BNDES, 2007).

Como exemplo, nos EUA, *Pew Charitable Trusts* divulgou números do FDA sobre o uso de antibióticos em fazendas pecuárias e os compararam com o uso humano. Nota-se que, enquanto o uso de antibióticos por humanos se estabilizou abaixo dos três milhões de kg anuais, as fazendas de gado atingiram um recorde de quase 13 trilhões de kg em 2011. Sendo assim, cerca de 70% de todos os antibióticos vendidos nos EUA foram utilizados na manutenção da saúde de animais destinados a produção de alimentos.

No controle de doenças em peixe, o uso de sulfonamidas potencializadas (associadas com diaminopirimidinas) possui um longo histórico. Nos EUA e Canadá é muito comum o uso de produtos que contenham a mistura de ormetoprim e sulfadimetoxina na razão 1:19. Na Europa e Ásia é preferida a mistura de sulfametoxazole e trimetoprim na razão 5:1 (Douglas, 2007; Harikrishnan, 2011).

Utilização das sulfonamidas no mercado brasileiro

O Brasil é um dos cinco maiores mercados veterinários em todo o mundo e a aquicultura é o setor de produção de alimentos de origem animal de maior crescimento no país (FAO, 2013; MPA, 2012). O setor vem apresentando crescimento sustentado devido a três fatores: 1) aumento das exportações de produtos veterinários; 2) maior fiscalização sanitária e critérios cada vez mais exigentes para a comercialização, seja interna ou externamente; 3) maior conscientização dos criadores da importância de manter os rebanhos saudáveis, com programas sanitários eficientes e regulares.

A entidade representativa do setor antimicrobianos de uso veterinário é o Sindan. O sindicato fornece grande parte das informações obtidas sobre a indústria veterinária em artigos, análises de mercado e notícias (BNDES, 2007). De acordo com o Sindan, em 2012 o consumo de antimicrobianos representou 19% do total de medicamentos veterinários comercializado no Brasil. Os ruminantes (54,2%), aves (15,6%) e suínos (15%) representaram as principais espécies animais em consumo de produtos veterinários. A piscicultura não é contemplada pelo Sindam. Entretanto, no Brasil existem apenas três medicamentos veterinários registrados para o seu uso, sendo eles o florfenicol, a oxitetraciclina e o trichlorfon (Sindam, 2012).

Como um grande produtor mundial de proteína animal, o Brasil tem no mercado interno o principal destino de sua produção. Considerando a produção brasileira de carnes (bovina, suína e de aves) em 2010, estimada em 24,5 milhões de toneladas, temos que 75% dessa produção é consumida internamente no país (MAPA, 2013). A relação entre as exportações brasileiras e o comércio internacional mostra que, em 2009, as vendas de gado representam 30% do mercado, a carne de aves 41,4%, e a de suínos 12,4 % (Nonaka, 2012). A piscicultura, representa cerca de 1% em relação a produção mundial (FAO, 2012). O uso de modernos sistemas de planejamento e organização alinhada a novas tecnologias tem permitido o crescimento da produção de carne. Entre essas novas tecnologias estão os antimicrobianos, usados como promotores de crescimento (baixas doses), tratamento de doenças (altas doses) e prevenção (doses intermediárias) de doenças em espécies usadas na produção de alimentos (Nonaka, 2012).

Principais grupos na produção de alimentos no Brasil

Os grupos que fazem parte da produção de alimentos no Brasil são a aquicultura, avicultura, bovinocultura, equinocultura, leite, mel, ovos e suinocultura. Dentre os oito grupos, os que se destacam no consumo de sulfonamidas, no Brasil e no mundo, estão a avicultura, bovinocultura, e aquicultura (MAPA, 2013).

Emprego das sulfonamidas na medicina veterinária

Na medicina veterinária, o uso das sulfonamidas é altamente difundido. Porém, como resultado de mais de 50 anos de uso terapêutico desta, agentes patogênicos tem

mostrado resistência ao antimicrobiano em animais, limitando a sua eficácia. No entanto, as sulfonamidas são largamente usadas em combinação com outros medicamentos, como no caso das sulfonamidas potencializadas as quais são usadas na gestão de doenças em rebanhos (USP, 2007). Na Tabela 1, são apresentadas as doenças veterinárias mais comuns em diferentes espécies e que são tratadas com sulfonamidas.

Tabela 1. Doenças mais comuns em diferentes espécies de animais tratadas com sulfonamidas.

Doenças	Espécie animal	Tratamento
Doenças bacterianas	Peixe de criação	Sulfametoxazole e trimetoprim*
Coccidiosis" (coccidiose)	Gado, aves, ovelhas, cahorros e perus	Sulfametazina e Sulfadimetoxima
"Coryza" (coriza)	Aves	Sulfadimetoxina e sulfametazina
"Cystitis bacterial" (cistite bacteriana)	Gatos e cachorros	Sulfadimetoxina
"Diphtheria" (difteria)	Gado, bezerros	Sulfadimetoxina e combinação de sulfametazina, sulfanilamida e sulfatiazole.
"Bacterial enteritis" (enterite bacteriana)	Gado, bezerros, cachorros, potros, suínos e ovelhas.	Sulfametazina e para bezerros é utilizado sulfaclorpiridazina.
"Fowl cholera" (cólera aviária)	Aves e perus	Sulfadimetoxina
"Fowl typhoid" (tifóide aviária)	Aves e perus	Sulfaquinoxalina
"Pneumonia bacterial" (pneumonia bacteriana)	Gado, bezerros, potros, suínos, gatos e cachorros	Sulfadimetoxina, sulfametazina, combinação de sulfametazina e sulfatiazole e a combinação de sulfametazina, sulfanilamida e sulfatiazole.
"Necrotic pododermatitis" (pododermatite necrótica)	Gado	Sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfatiazole e a combinação de sulfametazina, sulfanilamida e sulfatiazole.
"Pullorum disease" (pulorose)	Aves	Sulfametazina
"Respiratory infections, bacterial" (infecções respiratórias bacterianas)	Gatos e cachorros, suínos e ovelhas	Sulfadimetoxina, sulfametazina e sulfatiazole
"Skin and soft tissue infections"(infecções leves e doenças da pele)	Gatos e cachorros	Sulfadimetoxina

Fonte: USP (2007); * <http://www.vetdepot.com/antibiotics.html>

Aspectos regulatórios

Regulamentação no Brasil

ANVISA - PAMvet

Em 2003, foi criado o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet), pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Este programa contempla ações de colheita de amostras no comércio e análise de resíduos, com o objetivo de avaliar a exposição do consumidor aos resíduos de medicamentos veterinários, por meio do consumo de alimentos de origem animal (Hashimoto, 2012).

O PAMvet foi desenvolvido pela ANVISA com o objetivo de operacionalizar sua competência legal de controlar e fiscalizar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, conforme determina o inciso II do parágrafo 1º do Art. 8º da Lei n. 9.782 de 26/01/1999. A implementação do PAMvet é resultado de recomendações originárias de um fórum de discussão promovido pela ANVISA em 2000 e 2001 (RDC n. 5/2000) o qual culminou em uma proposta “Medicamentos veterinários x Saúde Pública” que por sua vez continha duas linhas básicas de monitoramento: uma relativa ao tema de resíduos em alimentos e outra enfocando a resistência bacteriana. Para a interpretação dos resultados obtidos no PAMVet, utilizam-se LMR de medicamentos veterinários harmonizados no Mercosul (Resolução GMC n. 54/2000).

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e PNCRC (Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes)

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) é um programa federal de inspeção e fiscalização de alimentos, baseado na análise de risco, que visa verificar a presença de resíduos de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde do consumidor, como resíduos de medicamentos veterinários, agrotóxicos ou afins, e contaminantes ambientais (ex.: aflatoxinas e contaminantes inorgânicos tais como metais pesados) e que tem como objetivos principais:

- Verificar e avaliar as boas práticas agropecuárias (BPA), as boas práticas de fabricação (BPF) e os autocontroles ao longo das etapas das cadeias alimentares;
- Verificar os fatores de qualidade e de segurança higiênico-sanitária dos produtos importados de origem animal e vegetal, seus subprodutos e derivados de valor econômico.
- Fornecer garantias de um sistema que provenha a segurança e a inocuidade dos alimentos disponibilizados aos consumidores e que seja equivalente aos requisitos sanitários internacionais estabelecidos pelo MERCOSUL, Codex Alimentarius (CAC), OMC, e órgãos auxiliares (FAO, OIE, WHO).

O plano de amostragem do PNCRC/Animal segue a recomendação do *Codex Alimentarius* (*Codex Alimentarius Commission Guidelines – CAC/GL n° 71-2009*), baseado em conceitos estatísticos de população, prevalência de ocorrências de violações e intervalo de confiança de amostragem. O PNCRC é uma das ferramentas para garantir a segurança dos produtos de origem animal disponibilizados para consumo.

No Brasil, as sulfonamidas não são regulamentadas para uso na criação de peixes. Porém o MAPA, através do PNCR, monitora três sulfonamidas (sulfametazina, sulfatiazol e sulfadimetoxina) na piscicultura, sendo que o trimetoprim não é monitorado (Tabela 2). A legislação brasileira estabelece para as sulfonamidas um LMR $100 \mu\text{kg}^{-1}$ e $50 \mu\text{kg}^{-1}$ para o trimetoprim em tecidos comestíveis de animais (músculo e filé de peixe de criação) (MAPA, 2012). As amostras são oriundas dos estabelecimentos que possuem Serviço de Inspeção Federal (SIF) e o método de análise laboratorial para sulfonamidas se dá por triagem em cromatografia de camada delgada (CCD) (Hoff, 2008).

Tabela 2: Sulfonamidas monitoradas pelo PNCRC

Grupo	Analito	Matriz	Limite de referência (μkg^{-1})
Antimicrobianos	Sulfatiazol Sulfadimetoxina Sulfametazina	Peixes de criação	$100 \mu\text{kg}^{-1}$

Fonte: Programa setorial de controle de resíduos e Contaminantes em Pescado- PNCRB/2011 Instrução normativa n° 24, de 09 de agosto de 2011 (MAPA); DOU – N° 67, quinta feira, 5 de abril de 2012. O trimetoprim não é monitorado em pescados.

Regulamentação no mundo

O quadro legislativo da Segurança Alimentar é um determinante crítico para a solidez dos métodos analíticos que podem ser desenvolvidos. A legislação da Segurança Alimentar não é harmonizada em todo o mundo. No entanto, alguns órgãos internacionais são bastante reconhecidos, sendo o mais representativo o *Codex Alimentarius Commission*, oficializado pela FAO e WHO, responsável pelas normas de segurança de alimentos com base em risco as quais servem como uma referência no mercado internacional e um modelo para que países as utilizem em sua legislação. A Comissão do *Codex Alimentarius* foi criada em 1963 pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) e WHO (*World Health Organization*). A Comissão do *Codex Alimentarius* tem estabelecido valores de LMR para garantir que a exposição aos resíduos de contaminantes não seja acima daquela considerada segura (Cañada-Cañada, 2009).

O JECFA é o comitê científico da FAO e da OMS de especialistas em aditivos alimentares e contaminantes em alimentos. O JECFA se reúne desde 1956 e realiza a avaliação do risco associado ao consumo de aditivos alimentares, contaminantes, toxinas de ocorrência natural e resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, assessorando o *Codex Alimentarius* em suas decisões.

Com base em estudos toxicológicos, o JECFA estabelece, quando possível, a Ingestão Diária Aceitável (IDA) dos fármacos veterinários. A IDA é a quantidade estimada do fármaco, expressa em miligrama por quilo de peso corpóreo (mgkg^{-1} p.c.), que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem oferecer risco apreciável à saúde, na época da avaliação (ANVISA, 2013).

Por outro lado, o FDA nos Estados Unidos e a Comissão Européia tem estabelecido listas com níveis de tolerância, também conhecidas como Limite Máximo de Resíduos (LMR), para diferentes contaminantes em alimentos em um certo número de alimentos *in natura*, em base aos dados toxicológicos, ingestão diária aceitável e a performance da tecnologia analítica disponível.

O Limite Máximo de Resíduos (LMR) é a concentração máxima de resíduos resultante da utilização de um medicamento veterinário (expresso em mgkg^{-1} , mgL^{-1} , μgkg^{-1} ou μgL^{-1} de alimento) oficialmente aceita. Este limite baseia-se no tipo e quantidade de resíduos que não apresentam risco de toxicidade para a saúde humana, levando-se em

consideração a Ingestão Diária Aceitável (IDA). Os LMR também consideram as boas práticas veterinárias e levam em conta os resíduos presentes nos alimentos de origem vegetal e/ou no ambiente.

No Mercosul, para os medicamentos veterinários cujos valores de LMR não estão estabelecidos, utilizam-se os valores preconizados pelo *Codex Alimentarius* e na ausência destes, aqueles estabelecidos pela União Européia.

Na Ásia, a aquicultura é um importante componente no suprimento de alimentos, sendo este continente o mais significativo do globo na aquicultura, em especial a China. A exposição de animais não alvo e do meio ambiente a fármacos usados na aquicultura é inevitável, devido às características do sistema de criação e a forma que os fármacos são introduzidos. Para proteção da saúde pública na Ásia as diretrizes empregadas são:

- Princípios globais para contenção da resistência antimicrobiana em animais (*Global Principles for the Containment of Antimicrobial Resistance in Animals Intended for Food*), publicado pela WHO (*World Health Organization*).
- Padrões internacionais (*International Standards on Antimicrobial Resistance*) produzidos pela *World Organisation for Animal Health*.
- Publicações da *Commission Codex Alimentarius* como *Code of Practice to Minimize and Contain Antimicrobial Resistance* (CAC/RCP 61-2005) e o *Code of Practice for Fish and Fishery Products (Section 6- Aquaculture Production)* (CAC/RCP 52-2003).

Este Código de práticas foi ainda modificado de forma a incluir a abordagem da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP) descrita no Código de Práticas Internacionais Recomendadas – Princípios Gerais de Higiene Alimentar (CAC/RCP 1-1969, Rev.3 1997), Anexo: Sistema HACCP e Orientações para a sua Aplicação. Encontra-se descrito no Código um programa de pré-requisitos que cobre as orientações tecnológicas e os requisitos de higiene essenciais na produção de peixe, marisco e respectivos produtos, seguros para o consumo humano, e que cumprem os requisitos adequados dos padrões de produto do *Codex*. O Código também contém instruções sobre a aplicação do HACCP, que se recomenda para garantir a produção higiênica de peixe e produtos da pesca em cumprimento dos requisitos de saúde e de segurança (Park, 2012; CAC/RCP 52-2003).

Aspectos analíticos

Conforme a “European Commission Decision” 2002/657/EC, os métodos analíticos para o controle de resíduos de fármacos veterinários em produtos alimentícios de origem animal podem ser claramente distinguidos entre *screening* (rastreamento/detecção) e métodos confirmatórios. Métodos de *screening*, consistem em bioensaios, são com frequência suficientemente sensíveis, baratos, rápidos e alguns são confirmatórios, embora as vezes sem muita especificidade. Já os métodos confirmatórios, se baseiam em cromatografia líquida combinada com espectrômetro de massa (LC-MS/MS) e são requeridos para identificação inequívoca e se necessário quantificação do analito de interesse. Somente após a análise confirmatória, a amostra com contaminante suspeito pode ser declarada não conforme (Marazuela, 2009).

Podemos observar na Tabela 3 os diferentes métodos empregados na análise de sulfonamidas ao longo do tempo. Inicialmente as análises determinavam apenas um analito, porém, com o desenvolvimento e o aprimoramento das técnicas cromatográficas e de detectores, a capacidade de desenvolver métodos multirresíduos dos mais variados tornou-se possível.

Tabela 3: Métodos analíticos descritos na literatura para a determinação de sulfonamidas em diferentes matrizes.

Matriz	Analito	Tratamento da amostra	Técnica de determinação	Recuperação	Comentários	Referencia
Água, sedimentos, plantas aquáticas e animais do lago Baiyangdian	STZ, SP, SMX, SMZ, SDZ, SMR, SDMX, SIX, SMMX	Método EPA 1694 (US Environmental Protection Agency-EPA, 2007)	HPLC-ESI MS/MS, coluna X Terra MS C 18 (100 mm x 2 mm; 3µm), fluxo 0,2 mL/min. Fase móvel A: metanol: acetonitrila 1:1, v/v. Fase móvel B: 0,3% de ácido fórmico em água (0,1% de formiato de amônio pH 2,9). Gradiente: t _{0-2 min} = 10%A; t _{2-10 min} = 70%A; t _{10-14 min} = 100%A; t _{14-17 min} = 10%A; t _{17-31 min} = 10%A	Não informado	Sulfonamidas foram detectadas em todas as amostras.	Wenhui Li, 2012
Músculo de galinha orgânica	SG, SDZ, STZ, SP, SMR, SMT, SMZ, SMPD, SD, SDMX, SCPA, SMX, SIX, SMMX, SQ	QuEChERS, SPE. Foi usado 5,0 g de amostra e 21 mL de solução extratora. Solução de água: acetonitrila (1:3 v/v) com 1% de ácido acético.	LC-MS/MS, coluna Synergi Fusion-RP (100 mm x 2 mm, tamanho de partícula 2,5 µm). Fase móvel A: 0,1% ácido fórmico em água; Fase móvel B: 0,1% ácido fórmico em acetonitrila; Fase móvel C: 0,1% ácido fórmico em metanol. Gradiente: t= 0-3,5 min, rampa linear 100% A a 25%B, fluxo 0,2 mL/min.; t= 3,5-8,5 min, rampa linear para 25%B, 70% C fluxo 0,3 mL/min.; t= 8,5-15 min, manter 25%B, 70% C, fluxo 0,3 mL/min.; 25%B, 70%; t=15-16min, 100%A, fluxo 0,2 mL/min.	57% - 175%	Ótimos resultados usando PSA	Stubbings, 2009
Leite	SDD, SQ	QuEChERS, usando 10 g de amostra, 10 mL de acetonitrila com 1% de ácido acético mais 10 mL de 0,1 M de Na ₂ EDTA.	UPLC-MS/MS, C ₁₈ (100mm x 2.1mm, tamanho de partícula 1,7 µm). Fase móvel A: metanol; Fase móvel B: água com 0,01% de ácido fórmico; fluxo de 0,3 mL/min em gradiente. Gradiente: t ₀ B%= 90%; t _{5-6,5} A%= 100%; t _{7,5} B%= 90%;	SDD 94,9% para 50 µg/kg SQ 91,4% para 50 µg/kg	Efeito matriz	Aguilera-Luiz, 2008
Músculo	SDZ, STZ, SP, SMR, SMZ, SCP, SMMX, SMX, SQ, SDMX	Extraído com acetato de etila, centrifugado, resíduo resuspenso em acetato de etila, purificação usando Speeddisk column, eluído com metanol-	HPLC com C ₈ (25cm x 3 mm; tamanho de partícula de 5µm). Fase móvel A: Acetonitrila (%); B= H ₂ O (pH 4.5 com tampão acetato) (%) no modo gradiente: t ₀ A%= 15%; t ₂₂ : A%=41%; t ₂₄ : A%=15%; t ₃₀ : A=15%; detector UV a 270 nm.	Sulfatiazole 63%; as demais 72-63%	LOD: 30-70 ng/mL	Pecorelli et al 2004

		amonía (97,5:2,5,v/v)				
MEL	SG, SAN, SAM, SDZ, SMR, SME, SMZ, SMPD, SCP, SDD	Pré-tratamento da amostra, incluindo hidrólise ácida seguido pela extração líquido-líquido e SPE em forte trocador catiônico.	HPLC – fluorescência em coluna de fase reversa C18 (15 cm x 4,6 mm; ; tamanho de partícula de 5µm). Fase móvel Acetonitrila/ H ₂ O (pH 4.75 com tampão acetato de sódio); Detecção: comprimento de onda de excitação 420 nm e comprimento de onda de emissão de 485 nm.	40-67%	LOD 1 - 2 µg/kg LOQ 5 µg/kg.	Maudens et al 2004
Urina de suíno	SMZ e Ac-SMZ	Urina liofilizada foi descongelada, reconstituída adicionando água grau Milli-Q e deixado por 30 minutos a temperatura ambiente, gentilmente agitado a cada 10 min.	HPLC/MS/MS com coluna Zorbax SB-C18 30 cm x 2,1 mm; ; tamanho de partícula de 3,5 µm), usando um rápido gradiente (a partir de 20 a 80% metanol em 3 minutos), a PE Sciex API 365 triplo quadrupolo (QqQ), operado em modo SRM, ou a Finnigan LCQ ion-trap (IT) espectrômetro de massa, operado em escaneamento de íon em largo range, usado no final do detector. Eletrospray foi usado como técnica de ionização.	Informação não disponível	LOQ: 500 ng/mL	Bartolucci et al. (2000)
Carne e rim	SAN, SDZ, SMR, SDD, SMPD, SCP, SD, SMX, SQ, SDMX	Primeira extração com acetato de etila, acetona e posteriormente purificado por partição três vezes com água-diclorometano	HPLC com a coluna Chrompack (25cm x 4.6 mm ; tamanho de partícula de 5µm); fase móvel: acetonitrila-água (35/65, v/v) pH 3,0 contendo 0,01 mol/l de K ₂ HPO ₄ e detecção por fluorescência (λ_{ex} = 405 nm e λ_{em} = 490 nm)	64-75%	LOQ: 1 µg/kg para SQ e 0,5 µg/kg para as outras	Stoev & Michailova , 2000
Carne	SMZ	Extração por acetona/diclorometano, desengorduramento líquido-líquido e clean-up.	HPLC com uso do gradiente e detector fluorométrico após derivatização com fluoresceína a pH 3,0	Informação não disponível	LOD: 2-10 µg/kg	Barbieri et al. 1995
Salmão Chinook, músculo e fígado	SDMX	Extraído com diclorometano, evaporação do solvente, reconstituição com fase móvel usado no	HPLC (LC/MS/MS) com coluna ion-par (25cm x 4,6 mm; ; tamanho de partícula de 5 µm); detecção a 280 nm	78% em músculo; 61% em fígado	LOD: 50µg/kg em músculo e 200 µg/kg em fígado	Zheng et al. 1994

		HPLC				
Leite	SDZ, STZ, SP, SMR, SMZ, SCP, SQ, SDMX	Diluído com tampão fosfato de potássio (1 mol/l, pH 4,4) e passou por coluna Cyclobond-ISPE, eluído com metanol. Depois limpo usando coluna de troca iônica (alumina e AGMP-1)	HPLC usando coluna de fase reversa e detector de arranjo de diodo a 265 nm.	Informação não disponível	Informação não disponível	Agarwal 1993
Leite	SDD	Usando SPE em cartucho de C-18 eluído com acetato de sódio tampão/acetonitrila (70:30)	Análise HPLC foi realizada com as colunas LiChroSpher C-18 e SuperSpher C-18. A detecção foi realizada a 270 nm. A fase móvel foi tampão acetato de sódio (0,01mol/l; pH 4,6) e acetonitrila (85:15, 75:25)	130-74% µg/kg	LOQ: 10 µg/kg	Hoffmeister et al. 1991
Leite	SMZ	Extraído com clorofórmio, evaporado a securo, redissolvido em tampão potássio fosfato (pH 5,0) passado em coluna SPE cyclobond I, eluído em solução aquosa 50% de metanol.	HPLC com detecção UV a 265 nm.	83,2-88,2%	Informação não disponível	Agarwal 1990.
Tecido muscular do salmão	SDZ, SMR, SMZ, SP, SDMX	MPSD foi empregado por meio de que a amostra foi tratada com C-18 derivatizado com sílica gel e eluído com diclorometano	Análise em prato TLC usando etil acetato- n-butanol- metanol- amônia aquosa (35:45:15:2, v/v/v/v), detecção após spray com fluorescamina.	61,63,60,63 e 57% para SDZ, SMRZ, SMTZ, SDMX, SP, respectivamente.	LOD: 110, 440, 70, 130 e 130 ng/mL para SDZ, SMRZ, SMTZ, SDMX e SP, respectivamente	Reimer & Suarez, 1991

					nte.	
Leite	SMZ	Homogenização e uso de SPE em coluna com C-18 eluído com metanol	Análise por TLC com sílica gel 60 e eluído com metanol- ácido acético-acetona (1:5:94). Detecção por Fluorescência induzido com fluorescamina e quantificado com escaneamento densitométrico.	88,3-103,2%	LOQ: 510 ng/mL	Unruh et al. 1990
Plasma animal	SMZ	Filtração por membrana	TLC eluído com acetato de etila e escaneado com uma excitação em 310 nm.	Sem informação	LOD: 50 ng/mL	Bevill et al. 1978

Sulfacetamida (SAM); sulfametizole (SMT); Sulfadimetoxina (SDMX); sulfaguanidina (SG); sulfadiazina(SDZ); Sulfapiridina (SP); sulfatiazole (STZ); sulfamerazina (SMR); Sulfaquinoxalina (SQ); sulfisoxazole (SIX); Sulfadimidina (SDD); Sulfasalazina (SSZ); sulfametoxazole (SMX); Sulfametoxipiridazina (SMPD); Sulfametazina (SMZ); sulfamonometoxina (SMMX); sulfaclopiridazina (SCP); sulfaclopiridazina(SCPA); sulfadimidina (SDD); sulfanilamida (SAN); N4acetilsulfametazina(Ac-SMZ)

Aspectos de farmacocinética

O mecanismo de ação bacteriostática das sulfonamidas interfere com a biossíntese do ácido fólico em células bacterianas, pois elas competem com o ácido para-aminobenzóico (PABA) para incorporação da molécula de ácido fólico. Através da substituição da molécula de PABA e impedindo a formação da molécula do ácido fólico (que é requerida na síntese de DNA), as sulfonamidas evitam a multiplicação da célula bacteriana. Somente organismos que sintetizam seu próprio ácido fólico são suscetíveis à ação das sulfonamidas. A maioria das sulfonamidas são bem absorvidas pela via oral, com exceção das sulfonamidas entéricas, como as sulfaquinoxalinas as quais são minimamente absorvidas. A distribuição das sulfonamidas é amplamente realizada através do corpo. As sulfonamidas são primariamente biotransformadas no fígado, mas o metabolismo também ocorre em outros tecidos (USP, 2007, Formilvet, 2013).

A rota primária de eliminação das sulfonamidas é feita via excreção renal. Sulfonamidas são também excretadas, relativamente em pequenas quantidades, pelo leite, saliva e no trato gastrointestinal (USP, 2007). A velocidade de absorção e excreção, ou seja, a eliminação de resíduos, é uma preocupação de produtores e indústrias, especialmente com relação a animais destinados à produção de alimentos para o consumo humano. Quanto menor o período de carência menores são as chances de resíduos de sulfonamidas nos produtos finais. Evitar resíduos é um desafio. A principal razão da presença de resíduos acima do permitido pela legislação é o uso impróprio de medicamentos, com doses e período de tratamento acima do recomendado não respeitando o período de carência específico ao produto (Formilvet, 2013). Na Tabela 4 exemplifica o uso de sulfonamidas em diferentes matrizes, com o LMR, IDA e o período de carência de cada antimicrobiano em cada tipo de matriz.

Tabela 4: Valores de LMR, IDA e períodos de carência para sulfonamidas em diferentes matrizes.

Antimicrobiano	Matriz	LMR	IDA (JECFA)	Período de Carência *
Sulfonamidas	Peixe**	100 µgkg ⁻¹	0-50 µgkg ⁻¹	Dados não disponíveis
Sulfatiazol Sulfametazina Sulfadimetoxina	Mel***	10 µgkg ⁻¹	-	Dados não disponíveis
Sulfametoxazol + trimetoprim	Aves Bovina Equino Leite Ovos Suínos	100 µgkg ⁻¹	-	5 dias 5 dias 5 dias 7 dias - 5 dias
Sulfadimetoxina	Aves Bovina Leite Suínos	100 µgkg ⁻¹	-	7 dias 30 dias 30 dias 20 dias
Sulfanilamida pomada	Bovina Leite	Não monitorado	-	5 dias 72 horas
Sulfadiazina + Trimetoprim	Bovina Equino Leite Suínos	100µgkg ⁻¹ para sulfas, trimetoprim(não monitorado)	-	5 dias 5 dias 72 horas 5 dias
Sulfaguanidina	Aves Bovina Leite Suínos	Não monitorado	-	28 dias 28 dias 72 horas 28 dias
Sulfanilacetamida	Bovina Equino Leite	Não monitorado	-	72 horas 72 horas 72 horas
Trimetoprim	Aves Bovina Equino Leite Ovos Suínos	100 µgkg ⁻¹ -- -- -- -- --	252 µg/pessoa	16 dias 16 dias 16 dias 7 dias - 16 dias

*Compendio de produtos veterinários SINDAN e MAPA, 2013.

** Para criação de peixes não há medicamento específico

*** Para criação de abelhas para produção de mel não há medicamento específico

Efeitos adversos na saúde de animais de criação

O primeiro registro do uso de antibióticos na piscicultura foi em 1948. Neste ano, Gutsell testou vários tipos de sulfonamidas e sua eficácia no tratamento de doenças bacterianas em peixe. Embora a maioria se mostrou efetiva e de grande benefício para o piscicultor, certos problemas foram associados ao seu uso. Como, problema de palatabilidade, danos ao rim e esterilidade reprodutiva. Entretanto, de muito mais

importância é a velocidade com que os microrganismos inicialmente sensíveis desenvolvem resistência. Por causa destes problemas foi decidido avaliar uma nova combinação antibacteriana, trimetoprim e sulfonamidas, introduzida com evidente sucesso na medicina humana e veterinária (McCarthy, 1974).

Segundo a *Pew Commission on Industrial Farm Animal Production* o problema da resistência microbiana está aumentando nos EUA e no mundo. A resistência microbiana é uma das maiores crises de saúde pública de nosso tempo. A exposição da bactéria a concentrações subletais de antibióticos resulta na seleção de estirpes mais resistentes, cuja capacidade de resistência é passada a outras bactérias, que por sua vez têm se mostrado resistentes à diversos tipos de antibióticos (Silbergeld, 2008).

Sulfonamidas são distribuídas no leite em concentrações muito abaixo da dose terapêutica, mas alta o suficiente para produzir resíduos. Para muitas sulfonamidas, 0,5 a 2% do total da dose são encontradas no leite. Na lactação diária de gado a concentração de sulfametazina é, aproximadamente, 20% da concentração existente no sangue (USP, 2007). Por isso, o controle sobre o uso inadequado é de alta prioridade internacional. Como o modelo industrial de produção de alimentos de origem animal é adotado em todo o mundo para aves, suínos, bovinos e organismos aquáticos, há uma necessidade urgente de instituir diretrizes para o uso prudente de medicamentos na produção animal e de alimentos excluindo o uso fármacos como promotores de crescimento (Silbergeld, 2008).

Efeitos adversos na saúde humana

Muitas evidências científicas sobre o uso de antibióticos na produção de alimentos de origem animal pode levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana. Esta resistência pode ser transmitida para a população geral diminuindo as chances de cura por resistência aos tratamentos. A disseminação da resistência dos microrganismos pode ocorrer em hospitais e comunidades. É reconhecido que uma das rotas de transmissão pode ser a partir de bactérias de animais para humanos através da cadeia alimentar (Cañada-Cañada, 2009). A maioria das sulfonamidas apresenta meia-vida relativamente longa e representam problemas para a saúde humana, dentre os quais estão reações alérgicas ou tóxicas (FAO, JECFA, 2013). Pacientes alérgicos a uma sulfonamida, pode ser alérgico a outras sulfonamidas também (USP, 2007).

Considerações finais

O atual cenário mundial de produção de alimentos revela o grande interesse da sociedade em relação a alimentos mais saudáveis e a segurança do alimento consumido, o qual está diretamente ligado às boas práticas veterinárias de produção. Na necessidade de minimizar perdas por infecções, ou no intuito de aumentar o rendimento da produção, agentes antimicrobianos tem sido usados em larga escala em todo o mundo. Entre estes antimicrobianos se destacam as sulfonamidas, as quais possuem alta prioridade no monitoramento de seus resíduos devido ao crescente número de violações ocorridas nos mais variados campos da pecuária, em particular a aquicultura. Na tentativa de minimizar o número de violações, o uso de antibióticos agora, possuem seu uso restrito ao tratamento e de doenças. Um grande problema associado ao uso indiscriminado de antibióticos é o desenvolvimento da resistência bacteriana, cuja capacidade de resistência é passada a outras bactérias, que por sua vez tem se mostrado resistentes à múltiplos tipos de antibióticos.

Há evidencias consideráveis associando o uso de antimicrobianos na agropecuária com patógenos resistentes no fornecimento de alimentos e no meio ambiente. Pelo fato da baixa dose levar ao desenvolvimento da resistência microbiana, é de grande importância o monitoramento de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal destinados ao consumo humano. Na Europa e países desenvolvidos o monitoramento destes resíduos possui alta prioridade, sendo que para exportar produtos alimentícios de origem animal a estes países é necessário se adequar as normas estabelecidas por seus órgãos regulatórios.

Referências Bibliográficas

- Agarwal, V. K.; Detection of sulphamethazine residues in milk by high-performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**. no.13, p.3531-3539, 1990.
- Agarwal, V. K.; Application of solid-phase for the analysis of sulphonamides in milk by high-performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**. no.16, p.3793-3799, 1993.
- Aguilera-Luiz, M. M.; Martinez, J. L.; Romero-Gonzalez, R.; Frenich, A. G.; Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. no. 1205, p.10-16, 2008.
- Alaburda, J.; Ruvieri V.; Shundo, L.; Almeida, A. P.; Tiglea, P.; Sabino, M.; Sulfonamidas em leite por cromatografia líquida de alta eficiência com derivação pré-coluna e detecção por fluorescência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. vol. 42, no. 11, Brasília Nov. 2007.
- Annex to Commission Regulation (EU) No 37/2010*, pagina L15/63 Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf> MRL sulfonamidas, acessado em 04/02/2013.
- ANVISA, 2013. Comitê de Especialistas da FAO/OMS em Aditivos Alimentares – JECFA Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/iqM>>. acessado em 03/2013
- ANVISA – 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29/05/2003, Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acessado em 07/2012.
- ANVISA - PAMVet: Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal- PAMvet Relatório 2006-2007. Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo- Junho 2009- Anvisa Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Monitoramento+e+Pesquisa/2408e3804fddb924be6fffacfa6b37f1>> > acessado em 03/2012.
- Barbieri, G.; Bergamini, C.; Ori, E.; Resca, P.; Determination of sulphonamides in meat and meat products. **Industrie Alimentari**. no. 34, p.1273-1276, 1995.

- Bevill, R. F.; Schemske K. M.; Luther H. G.; Dzierzak E. A.; Limpoka M.; Felt Dr.;
Determination of sulphonamides in swine plasma. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. no. 26, p. 1201-1203, 1978.
- BNDES- Panorama da Indústria veterinária farmacêutica BNDES, setorial, RJ, no. 25,
p.157-174, mar. 2007.
- Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura (Brasil 2010) Disponível em: <
[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%
C3%ADstico%20MPA%202010.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf)> acessado em 02/2013.
- Boscher, A.; Guignard, C.; Pellet, T.; Hoffmann, L.; Bohn, T.; Development of a multiclass
method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** . v.
1217, p.6394-6404, 2010.
- Cañada-Cañada, F.; Peña, A. M.; Espinosa-Mansilla, A.; Analysis of antibiotics in fish
samples. **Anal Bioanal Chem**. v.395, p. 987-1008, 2009.
- Compendio de produtos veterinários SINDAN, disponível em< www.cpv.com.br >
acessado em 04/2013.
- CAC/RCP52-2003; Codex Alimentarius Commission. CÓDIGO DE PRÁTICAS PARA
PEIXE E PRODUTOS DA PESCA (CAC/RCP 52-2003, Rev. 1-2004) Disponível
em: <<http://www.esac.pt/noronha/manuais/Codex%20-%20CBP%20Peixe.pdf>>
Acessado em 04/2013.
- CAC/RCP 61-2005; Codex Alimentarius Commission. CODE OF PRACTICE TO
MINIMIZE AND CONTAIN ANTIMICROBIAL RESISTANCE. Acessado em
04/2013.
- Cheng, Y.; Huang, S. Singco, B.; Huang, H. Analyses of sulfonamide antibiotics in meat
samples by on-line concentration capillary electrochromatography-mass
spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v.1218, p.7640-7647, 2011.
- Cronly, M.; Behan, P.; Foley, B.; Malone, E.; Earley, S.; Gallagher, M.; Shearan, P.;
Regan, L.; Development and validation of a rapid multi-class method for
confirmation of fourteen prohibited medicinal additives in pig and poultry compound

feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 53, p. 929-938, 2010.

Defoirdt, T.; Sorgeloos, P.; Bossier, P.; Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. **Current Opinion in Microbiology.** v. 14, p. 251-258, 2011.

DOU N° 67, quinta feira, 5 de abril de 2012. Instrução normativa nº 24, de 09 de agosto de 2011.(MAPA); "Quadro Geral dos Resultados do Monitoramento do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, de Aves, Suína e Equina), em Leite, Mel, Ovos e Pescados e Avestruz no Exercício de 2011". Disponível em <http://agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2024%20-%20PNCRB%202011%20-%20VERSAO%20-%204-8-2011%20enviado%20publica%C3%A7%C3%A3o.pdf> acessado em 03/2013.

Douglas, I.; Ruane, N.M.; Geary, M.; Carroll, C.; Fleming, G.T.A.; McMurray, J.; Smith, P.; The vantages of the use of discs containing single agents in disc diffusion testing of the susceptibility of *Aeromonas salmonicida* to potentiated sulphonamides. **Aquaculture.** v. 272, p. 118-125, 2007.

EMEA/MRL/828/02- FINAL(The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Inspections) 2002. Committee for Veterinary Medicinal Products (Trimetoprim). <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015682.pdf> Acesso 04/02/2013.

FAO, 2005. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Responsible use of antibiotics in aquiculture. Disponível em: <<http://tp.fao.org/docrep/fao/009a0282e/a0282e00..pdf>> acessado em 08/2012

FAO, 2012 “World Review of Fisheries and Aquaculture, Part 1” Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e01.pdf>> acessado em 16/03/2013

FAO, 2013. Yearbook 2010 Fishery and Aquaculture Statistics Disponível em: <<http://www.fao.org/fi/website/MultiQueryAction.do>> acessado em 02/2013.

- FAO, 2013 "World Review of Fisheries and Aquaculture, Part 1" Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e01.pdf>> acessado em 03/2013.
- FAO, 2013 "Chemical risks and JECFA" Disponível em: < www.fao.org/ag/agn/jecfa > acessado em 03/2013 .
- Harikrishnan, R.; Balasundaram, C.; Heo,M.; Fish health aspects in grouper aquaculture. **Aquaculture**, v.320, p. 1-21, 2011.
- Formilvet,2013;"Sanidade:Sulfonamidas." Disponível em: <http://www.formilvet.com.br/pork59_sanidade.pdf> acessado em 08/2013
- Hashimoto, J. C., Paschoal, J. A. R., Queiroz, S. C. N., Ferracini, V. L., Assalin, M. R., Reyes, F. G. R.; A Simple Method for the Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green Residues in Fish by a Modified QuEChERS Extraction and LC/MS/MS. *Journal of AOAC International*, 95(3), 913-922, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.11-140>.
- Herrera-Herrera,A.V.;Hernandez-Borges,J.;Borges-Miguel,T.; Rodriguez-Delgado,M.A.; Dispersive liquid-liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 75,p. 130-137,2013.
- Hoff, R. Análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas. Porto Alegre,129p,; 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande de Sul. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/15825>. acessado em 07/2013.
- Hoffmeister A.; Suhren G.; Heeschen W.; High pressure liquid chromatographic determination of sulphadimidine residues in milk- incidence in consumer from various European countries. **Milchwissenschaft. Milk Science International**. no. 46, p. 770-774, 1991.
- ITAL, 2010; Brum, R.C.; Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal. Disponível em:

http://www.ital.sp.gov.br/ccqa/eventos/pos_evento/2010/iv-conali-01-e-02-de-setembro/pncrc_renato%20brum.pdf). Acessado 03/2013.

Kantiani, L.; Farré, M.; Freixiedas, J. M. G. I.; Barceló, D.; Development and validation of a pressurised liquid extraction liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for β -lactams and sulfonamides in animal feed. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4247-4254, 2010.

Le-Minh, N.; Stuetz, R. M.; Khan, S. J.; Determination of six sulfonamide antibiotics, two metabolites and trimethoprim in wastewater by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass. **Talanta**. v. 89, p. 407-416, 2012.

MAPA, 2013; Mercado Interno. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno>> acessado em 03/2013

MAPA, 2012; "Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal". Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>> acessado em 03/2013

McCarthy, D.H.; Stevenson, J.P.; Salsbury, A.W.; Combined In-vitro of trimethoprim and sulphonamides on fish-pathogenic bacteria. **Aquaculture**, v. 3, p. 87-91, 1974.

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

Mamani, M. C. V.; Reyes, R. F.G.; Rath, S.; Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. **Food Chemistry**. v. 117, p. 545-552, 2009.

MPA (Ministerio da Pesca); "Estatística da Pesca e Aquicultura 2010". Disponível em:

<http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura> , acessado em 02/2013.

Marazuela, M. D.; Bogialli, S.. A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. **Analytica Chimica Acta**. v. 645, p. 5-17, 2009.

- Maudens, K.E.; Zhang, G.F.; Lambert, W.E.; Quantitative analysis of twelve sulphonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography**. no. 1074, p. 85-92, 2004.
- National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals (NRA). The NRA Review of Sulphonamides. p. 1-42 August 2000, Disponível em: <<http://www.apvma.gov.au/products/review/docs/sulphonamides.pdf>> acessado em 04/2013
- Nonaka, C.K.V.; Oliveira, A.M.G.; Paiva, C.R.; Almeida, M.P.; Resende, C.P.; Moraes, C.G.O.; Botelho, B.G.; Souza, L.F.; Dias, P.G.; Occurrence of antimicrobial residues in Brazilian food animals in 2008 and 2009. **Food Additives and Contaminants**, v.29, no. 4, p. 526-534, April 2012.
- PAMvet: Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal- PAMvet Relatório 2006-2007 – Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo- Junho 2009- Anvisa. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d7ab358047458ad19443d43fbc4c6735/PAMVET.pdf?MOD=AJPERES>> acessado em 03/2013.
- Park, Y. H.; Hwang, S.Y.; Hong, M.K.; Kwon, K.H.; Use of antimicrobial agents in aquaculture. **Rev. sci.tech.Off.int.Epiz.**, **31**, (1), p. 189-197, 2012.
- Paschoal, J. A. R.; Rath, S.; Airoidi, F.P.S.; Reyes, F. G. R.; "Validation of Chromatographic Methods for the Determination of Veterinary Drug Residues in Food". **Quim. Nova**. v. 31, No. 5, p. 1190-1198, 2008.
- Pecorelli, I.; Bibi, R.; Fiorino, L.; Galarini, R.; Validation of a confirmatory method for determination of sulphonamides in muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**. v.1032, p. 23-29, 2004.
- Pew Charitable Trusts. "Human health and industrial farming". Disponível em: <http://www.pewtrusts.org/our_work_detail.aspx?id=328756> acessado em 07/2013
- PNCR; Anexo I- Plano Nacional e Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal; Disponível em:

http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/establecimientos_habilitados_exportar/normativa/Brasil/rogr_control_res_productos.pdf, acessado em 02/2013.

Quesada, S. P.; Paschoal, J. A. R.; Reyes, F. G. R.; Considerations on the Aquaculture Development and on the Use of Veterinary Drugs: Special Issue for Fluorquinolones- A review. **Journal of Food Science**. vol. 78 (9), p. R1321-R1333, 2013.

Reimer G. J.; Suarez, A.; Development of a screening method for 5 sulphonamides in salmon muscle-tissues using thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography**. no. 555, p. 315-320, 1991.

Rodríguez, R. E. C.; Galán, M. J. G.; Blánquez, P.; Cruz, M. S. D.; Barceló, D.; Caminal, G.; Vicent, T.; Continuous degradation of a mixture of sulfonamides by *Trametes versicolor* and identification of metabolites from sulfapyridine and sulfathiazole. **Journal of Hazardous Materials**. v. 213-214, p. 347-354, 2012.

Samanidou, V. F.; Evaggelopoulou, E. N.; Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish. **J. Sep. Sci**. v. 30, p. 2549-2569, 2007.

Samuelson, O. B.; Pursell, L.; Smith, P.; Ervik, A.; Multiple-dose pharmacokinetic study of Romet in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and in vitro antibacterial activity against *Aeromonas salmonicida*. **Aquaculture**, v. 152, p. 13-24, 1997.

Sapkota, A.; Sapkota, A. R.; Kucharski, M.; Burke, J.; Mckenzie, S.. Aquaculture practices and potencial human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**. v 34, p. 1215-1226, 2008.

Silbergeld, E. K.; Price, L.; Graham, J.; Antimicrobial Resistance and Human Health. jan 30, 2008. Disponível em: <http://www.pewtrusts.org/our_work_detail.aspx?id=328756> acessado em 04/2013.

Sindan, 2012; Mercado Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>> acessado em 03/2013

Sindan-BNDES, 2007. Capanema, L.X.L.; Velasco, L.O.M.; Souza, J.O.B.; Noguti, M.B.; Panorama da Indústria Farmacêutica Veterinária. BNDES setorial, RJ, n 25, p. 157-174, marc. 2007 Disponível em:

<http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set2506.pdf> acessado em 04/2013.

- Spisso, B. F.; Nóbrega, A. W.; Marques, M. A. S.; Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência & Saúde Coletiva**. 14 (6): p. 2091-2106, 2009.
- Stoev, G.; Michailova, A. L.; Quantitative determination of sulphonamide residues in food of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography**. no. 871, p. 37-42, 2000.
- Stubbings, G.; Bigwood, T.; The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach. **Analytica Chimica Acta**, V. 637, p. 68-78, 2009.
- Uno, K.; Aoki, T.; Ueno, R.; Pharmacokinetics of sulphamonomethoxine and sulphadimethoxine following oral administration to cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.115, p. 209-219, 1993.
- Unruh, J.; Piotrowski, E.; Schwartz, D. P.; Barford, R.; Solid-phase extraction of sulphamethazine in milk with quantitation at low ppb levels using thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography**. no. 519, p. 179-187, 1990.
- USP, 2007. DI Volume I. The human monograph *Sulfonamides (Systemic)* 2007.
- Wenhui Li; Yali, Shi; Gao, L.; Liu, J.; Cai, Y.; Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. **Chemosphere**. V. 89, p.1307-1315, 2012.
- Zheng, M.; Liu, H. Y.; Hall, S. F.; Kitts, D. D.; McErlane, K. M.; High-performance liquid chromatography analysis of Romet-30 in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): Wash-out time, tissue distribution in muscle, liver and skin, and metabolism of sulphadimethoxine. **Journal of Chromatography**. no.670, p. 77-78, 1994.

CAPÍTULO III

**Determinação de resíduos de sulfonamidas e trimetoprim em filé
de tilápia (*Oreochromis niloticus*) empregando**

UPLC-ESI-QToF MS

Resumo

Com o intuito de identificar o potencial risco das sulfonamidas e o trimetoprim para a saúde dos consumidores, métodos analíticos específicos e sensíveis são necessários para monitorar os níveis de resíduos nos alimentos.. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do PNCRC/Pescado/2008 (Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes), tem monitorado três sulfonamidas em peixes de criação (sulfametazina, sulfatiazol e sulfadimetoxina) (PNCRC, 2009). Este trabalho descreve o desenvolvimento de um método multirresíduo para determinação de sulfonamidas (sulfapiridina, sulfamerazina, sulfatiazole, sulfametazina, sulfadimetoxina, sulfametoxazole, sulfametoxipiridazina) e trimetoprim em filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*) empregando um sistema de cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas (UPLC-ESI-QToF MS). O método de preparo da amostra foi baseado na técnica QuEChERS. Para tanto, as sulfonamidas foram extraídas do filé de tilápia com acetonitrila, sendo que para limpeza do extrato foi empregada a extração em fase sólida dispersiva (D-SPE), utilizando sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$) e amina primária e secundária (PSA). Para a análise cromatográfica foi utilizada uma coluna de fase reversa Agilent Poroshell 120 EC C_{18} (50 x 2,1mm, 2,7 μ m) a 25⁰C, com vazão de 0,2 mL min⁻¹. A fase móvel foi composta por uma solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila, com eluição isocrática. O método analítico desenvolvido foi validado e para todas as sulfonamidas e o trimetoprim. Os parâmetros de validação foram: linearidade (r) maior do que 0,99; limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) de 1 ng g⁻¹ e 5 ng g⁻¹, respectivamente. A precisão intra e interdia apresentaram valores de coeficiente de variação (CV %) menores do que 15,0 %; o limite de decisão Para as sulfonamidas o valor de $CC\alpha$ variou entre 102,6 e 120,0, e para $CC\beta$ entre 111,7e 140,1. Para o trimetoprim o valor de $CC\alpha$ e $CC\beta$ foi de 70,0 e 89,9, respectivamente. Os resultados obtidos indicam que o método é apropriado para a determinação de sulfonamidas e trimetoprim em filés de tilápia.

Palavras-chave: resíduo, sulfonamida, filé, tilápia, QuEChERS, UPLC-ESI-QToF MS.

Abstract

In order to identify the potential risk of sulfonamides and trimetoprim to the consumer health, specific and sensitive analytical methods are required for monitoring residue levels in foods. In Brazil, the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA), through PNCRC/Pescado/2008 (National Plan for Control of Residues and Contaminants), has monitored three sulfonamides in fish farming (sulfamethazine, sulfathiazole and sulfadimethoxine) (PNCRC, 2009). This paper describes the development of a multiresidue method for the determination of sulfonamides (sulfapyridine, sulfamerazine, sulfathiazole, sulfamethazine, sulfadimethoxine, sulfamethoxazole, sulfamethoxy-pyridazin) and trimethoprim in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillet using a liquid chromatography system coupled to mass spectrometry (UPLC-ESI-QToF MS). The method extraction technique was based on the QuEChERS procedure for sample preparation. For this purpose, sulfonamides were extracted from the tilapia fillet with acetonitrile, and dispersive solid phase extraction (D-SPE), using anhydrous magnesium sulfate ($MgSO_4$) and primary and secondary amine (PSA), was used for the extract clean-up. An Agilent reverse phase column Poroshell 120 EC C18 (50x2.1 mm, 2.7 μm) at 25°C, with a flow rate of 0.2 mL min^{-1} was used for chromatographic analysis. Mobile phase consisted of an aqueous solution of 0.1 % formic acid and acetonitrile, with isocratic elution. Analytical method was developed and validated for all the sulfonamides and trimethoprim; validation parameters were: Linearity: > 0.99; LOQ = 1 ng g^{-1} ; LOQ = 5 ng g^{-1} ; intra-day precision: CV less than 15.0 %; interday precision: CV less than 19.1%; For sulfonamides, the value of $CC\alpha$ varied between 102.6 and 120.0, and 111.7 and 140.1 between $CC\beta$. For the value of trimethoprim and $CC\alpha$ $CC\beta$ was 70.0 and 89.9, respectively. The results indicate that the method is suitable for the determination of sulfonamides and trimethoprim in tilapia fillets.

Keywords: residue, sulfonamida, finfish, fillet, QuEChERS, UPLC-ESI-QToF MS.

Introdução

O Brasil é um dos cinco maiores mercados veterinários em todo o mundo e a aquicultura é o setor de produção de alimentos de origem animal de maior crescimento no país (FAO, 2013; MPA, 2013).

Sulfonamidas pertencem a um importante grupo de antimicrobianos sintéticos que tem sido utilizados na medicina humana e veterinária por mais de 60 anos. Recentemente, esses fármacos tem sido extensivamente empregados na produção de alimentos de origem animal, uma vez que é praticamente impossível manter o ambiente produtivo isento de organismos patógenos. Assim, o uso de sulfonamidas tem sido uma excelente ferramenta para ajudar a alcançar altos níveis de produtividade, com maior crescimento, eficiência alimentar e com redução da mortalidade e morbidade (Nonaka, 2012). Todavia, seus resíduos tem sido uma grande preocupação, devido à possibilidade de risco à saúde humana, com desenvolvimento de resistência bacteriana e reações adversas, tais como reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis (Pecorelli, 2004).

Na piscicultura, antimicrobianos, entre eles as sulfonamidas, são utilizados para tratamento de doenças bacterianas. A maioria das bactérias patógenas de peixe, tais como as *Aeromonas sp*, *Pseudomonas sp* e *Vibrio sp* estão geralmente envolvidas com doenças tais como úlceras e septicemia hemorrágica causando um grande número de mortalidade (Samanidou, 2007). Na Ásia é comum o uso de sulfonamidas para o controle de *vibriosis* causada pelo *Vibrio carchariae* e *V. alginolyticus*, sendo esta uma das mais importante enfermidade (Harikrishnan, 2011). Na Figura 1 e Figura 2 estão apresentadas as fórmulas estruturais geral e dos grupos funcionais substitutivos ao grupo R, das sulfonamidas usadas na prática veterinária no tratamento de doenças de peixes, ao redor do mundo.

De acordo com o *Committee for Veterinary Medicinal Products* da *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA/MRL/828/02), para as sulfonamidas a ingestão diária aceitável (IDA) estabelecida é de 0-50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pc, sendo essa uma IDA de grupo. O valor de limite máximo de resíduo (LMR) em peixes de criação é de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para as sulfonamidas individuais ou a somatória dos resíduos de todas as substâncias do grupo, sendo os tecidos alvos o músculo e pele em proporções naturais. Já o Japão estabeleceu um valor de LMR de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (*Annex I of Council Regulation* (EEC) No. 2377/90).

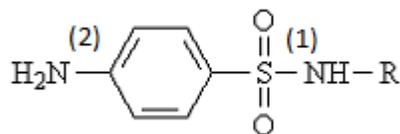


Figura 1: Fórmula estrutural geral das sulfonamidas

Fonte: (Wang et al, 2006).

Geralmente o grupo R das sulfonamidas (Figura 1, Fórmula Geral) é uma estrutura heterocíclica que torna o composto muitas vezes mais ativo do que a sulfanilamida original. Isto sugere que a atividade bacteriostática das sulfonamidas é favorecida pelo decréscimo da sua acidez.

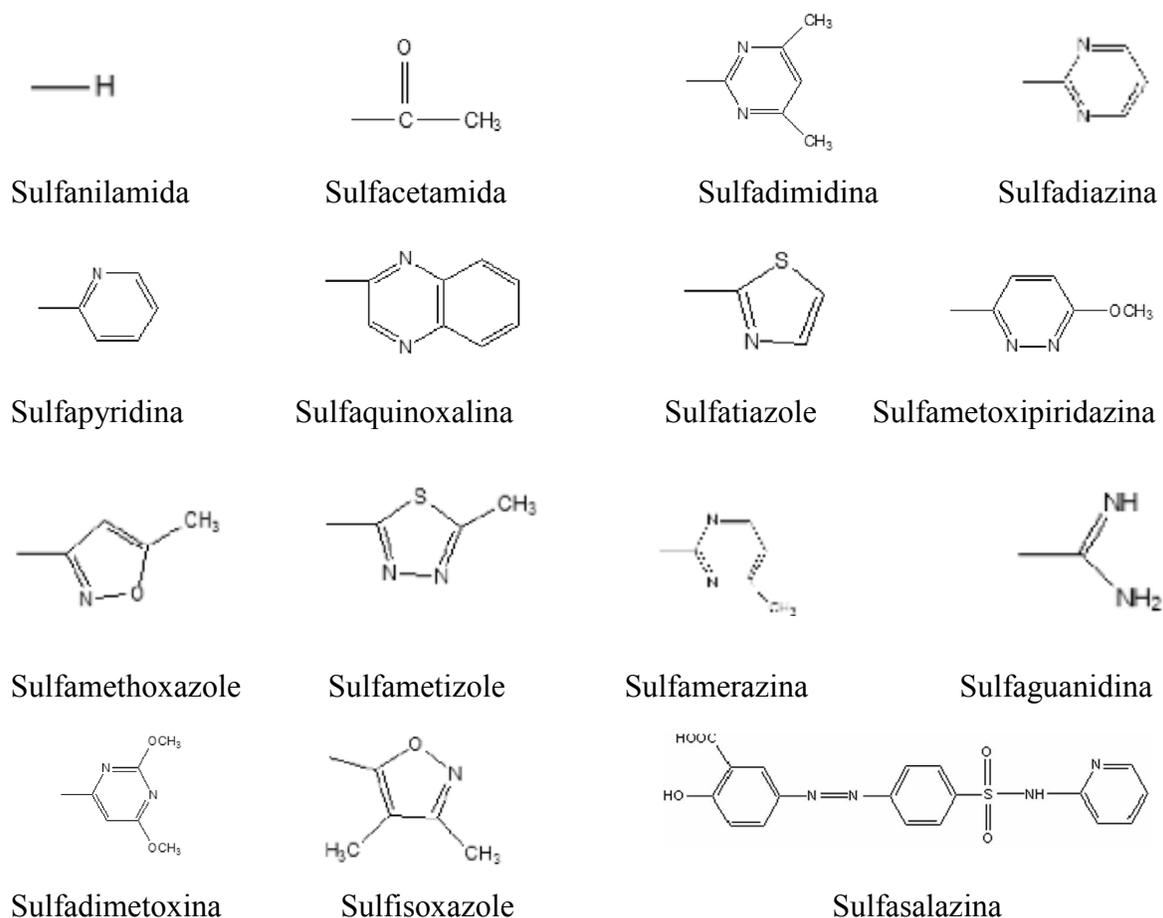


Figura 2: Fórmula estrutural dos grupos funcionais substitutivos ao grupo R da fórmula geral das sulfonamidas. Fonte: (Wang et al,2006).

A sulfonamida possui mais dois importantes grupos funcionais. O primeiro grupo funcional é a amina básica (N^2) e o segundo é a amida ácida (N^1) (Figura 1). Apesar da ampla distância entre o grupo R e N^2 o substituinte R parece ter um papel crucial no valor do pK_1 da sulfonamidas derivadas. Assim, o primeiro equilíbrio de dissociação refere-se ao equilíbrio do grupo funcional da amina (pK_1), e o segundo equilíbrio (pK_2) ao equilíbrio de dissociação do grupo funcional da amida cujos valores são apresentados na Tabela 1.

Em soluções acetonitrila-água, na proporção máxima de 70:30 (v/v) água-acetonitrila, observa-se que o pK_1 é menor quando comparado a equilíbrios somente em água. Este fenômeno é explicado através do índice de solvatação na molécula. Para proporções de até 30% de acetonitrila em sistemas acetonitrila-água, a principal solvatação é realizada pela água, onde a acetonitrila apenas preenche espaços entre as moléculas de água em torno das sulfonamidas (Sanli, 2009).

A Tabela 1 apresenta as constantes de dissociação para o equilíbrio envolvendo as sulfas em água e nas misturas de acetonitrila, bem como o número CAS. O número (CAS) "Chemical Abstracts Service" é uma referência internacional sobre as principais informações químicas-físicas e dados de segurança a respeito de qualquer substância química (CAS, 2013).

Tabela 1. Constantes de dissociação para o equilíbrio envolvendo as sulfonamidas em água e nas misturas acetonitrila-água.

Sulfonamidas	pKa ₁	pKa ₂	pK ₁ No sistema acetonitrila- água (30%ACN)	pK ₂ No sistema acetonitrila- água (30%ACN)	CAS
Sulfadiazina (SDZ)	1,94	6,33	1,43	7,11	68-35-9
Sulfamerazina (SMR)	2,27	6,71	1,83	7,49	127-79-7
Sulfatiazole (STZ)	1,89	7,12	1,62	7,49	72-14-0
Sulfametoxipiridazina (SMPD)	2,09	6,83	1,74	7,60	80-35-3
Sulfametoxazole (SMX)	1,49	5,41	1,28	5,91	723-46-6
Sulfadimetoxina (SDMX)	2,11	6,17	2,20	6,60	122-11-2
Sulfametazina (SMZ)	2,80	7,60	–	–	57-68-1
Sulfaguanidina (SG)	2,70	11,3	–	–	57-67-0
Sulfaquinoxalina (SQ)	2,34	5,97	2,34	6,33	59-40-5
Sulfametizole (SMT)	1,20	5,3	–	–	144-82-1
Sulfasalazina (SSZ)	2,40	8,3	–	–	599-79-1
Sulfisoxazole (SIX)	1,52	4,83	–	–	127-69-4
Sulfapiridina (SP)	2,90	8,43	–	–	144-83-2
Sulfadimidina (SDD)	2,80	7,60	-	-	57-68-1

Fonte: (Sanli, 2009; Sagati,2004)

Trimetoprim (Figura 3) é um agente antimicrobiano diaminopirimidina efetivo contra um amplo espectro de microrganismos gram-positivos e gram-negativos. Na medicina veterinária ele é geralmente usado em combinação com uma sulfonamida na proporção de 1:5 (m/m), dado o uso dessa associação dificulta o surgimento da resistência bacteriana. O trimetoprim está inscrito no *Annex I of Council Regulation* com LMR de 50 µg kg⁻¹ (em músculo e pele em proporções naturais para peixe de criação), sendo o valor de IDA relatado de 252 µg/pessoa (EEC No. 2377/90).

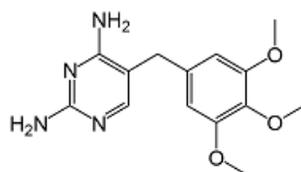


Figura 3: Fórmula estrutural do trimetoprim. (Fonte: Lopes, 2012)

As sulfonamidas tem efeito bacteriostático inibindo uma etapa intermediária da síntese do ácido fólico por mecanismo competitivo, e o trimetoprim a formação do metabólito ativo do ácido tetra-hidrofólico no final do processo. As células humanas conseguem aproveitar o folato exógeno para o metabolismo, enquanto as bactérias dependem da produção endógena (Figura 4) (ANVISA, 2013).

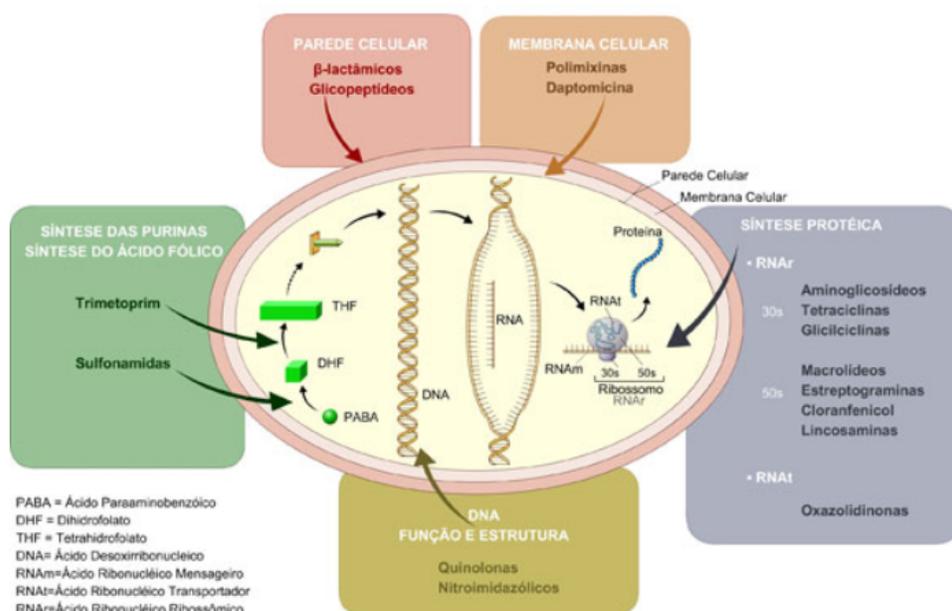


Figura 4: Mecanismo de ação das sulfonamidas e trimetoprim na célula bacteriana.

Fonte: ANVISA, 2013.

Historicamente, a determinação de resíduos de antimicrobianos em alimentos de origem animal é relativamente nova. Estudos foram iniciados na Bélgica, Holanda e Luxemburgo no final dos anos 60 e início dos 70. Na maioria dos países europeus, pesquisas com resíduos e sua aplicação em controle regulatório em animais abatidos iniciou-se posteriormente (De Bradander, 2009).

Um resíduo pode ser definido como traço de uma substância presente em uma matriz de origem animal em níveis de concentração na ordem de ppb ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ou ppt (ng kg^{-1}), sendo os interferentes problema frequente na determinação dessas substâncias e, portanto, devem ser considerados. A diferença das propriedades químicas entre os tipos de resíduos e a grande variedade de matrizes são algumas das adversidades a serem contornadas no desenvolvimento de métodos de análise de resíduos. Em 2003, Anastassiades *et al*, introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos denominado QuEChERS (rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro). Um novo método de “*Clean-up*” denominado extração em fase sólida dispersiva (D-SPE) foi proposto juntamente com o método QuEChERS, onde uma alíquota do extrato é colocada em contato com uma mistura contendo o sorvente amina primária-secundária (*primary secondary amina*, PSA) e sulfato de magnésio (MgSO_4). Ao contrário dos métodos existentes para *clean-up* com extração em fase sólida (SPE) que utilizam cartuchos ou colunas, a D-SPE permite que o *clean-up* e a redução de água residual sejam efetuados de uma forma rápida e simultânea. O sorvente retém as interferências da matriz, sendo que depois da agitação manual e centrifugação o extrato estará pronto para ser injetado no sistema cromatográfico. A estrutura bidentada do PSA tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário. Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte (Prestes, 2009).

Nos EUA o método QuEChERS foi adotado em 2007 como oficial pela Associação Oficial de Química Analítica (AOAC) para determinação de resíduos de pesticidas em alimentos, sendo também considerado método oficial pelo Comitê Europeu de Normatização. Além disso, durante a 39^o sessão do Comitê de Resíduos de Pesticidas do *Codex Alimentarius* realizada em 2007, os EUA apresentaram a proposta de oficialização deste, como método padrão do *Codex Alimentarius* (Prestes, 2009).

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS) é uma técnica analítica frequentemente utilizada na determinação de compostos que apresentam baixa volatilidade e/ou instabilidade térmica (Queiroz, 2012; Lacina, 2010; Lehotay, 2010). Apesar da complexidade dos alimentos ser um problema na análise dessas amostras, a elevada seletividade da espectrometria de massas permite a

simplificação da marcha analítica usualmente utilizada quando são empregadas outras técnicas de detecção, como a espectrofotometria (Turnipsed, 2012; Hashimoto, 2012). Ainda, a capacidade do analisador de massa tempo de voo (ToF) além de permitir identificar a massa de um componente com alta exatidão ($\pm 0,005$ Da), permite que detecte com suficiente seletividade baixos níveis (ng g^{-1}) de resíduos de contaminantes em matrizes de alimentos complexos (Turnipsseed, 2012).

Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi o de desenvolver e validar um método multirresíduo para análise de sulfonamidas e trimetoprim em filé de tilápia utilizando UPLC-QToF MS. O método de extração foi baseado na metodologia QuEChERS a qual foi modificada para se adequar a extração dos resíduos dos analitos do filé de tilápia. A etapa de *clean up* foi desenvolvida baseada no método D-SPE que é a extração em fase sólida dispersiva, para o qual foi utilizado PSA como sorvente e MgSO_4 para remoção da água residual. O método analítico foi validado a partir de um protocolo intra-laboratorial estabelecido tomando-se como base as recomendações dos principais guias nacionais e internacionais de validação (MAPA, 2011; EC, 2002; IUPAC, 2002). A seleção dos fármacos representantes do grupo das sulfonamidas foi realizada a partir de um estudo sobre o uso destes fármacos na piscicultura no mundo, assim como as sulfonamidas monitoradas pelo PNCRC/Pescado (MAPA, 2011).

Materiais e métodos

Padrões analíticos, solventes e reagentes

Os padrões de sulfonamidas que foram adquiridas para este estudo são: Sulfatiazole (STZ), Sulfametoxazole (SMX), Sulfamerazina (SMR), Sulfametoxipiridazina (SMPD), Sulfadimetoxina (SDMX), Sulfapiridina (SP), Sulfametazina (SMZ). Todos os padrões apresentam teor $> 99,0\%$ e foram adquiridos da Fluka Analytical/Sigma Aldrich, USA. O padrão Trimetoprim (TMP), apresenta teor $> 99,0\%$ e foi adquirido da Fluka Analytical/Sigma Aldrich, USA.

A amina primária/secundária (PSA) foi adquirido da UCT, Inc. (Bristol, USA) e o ácido fórmico (98%) foi adquirido da Merck, Brasil, o sulfato de magnésio anidro pó da

J.T. Baker, Japão, e o acetato de sódio anidro da Spectrum Chemical, USA. Todos os solventes utilizados foram grau HPLC e todos os reagentes grau analítico. Metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) foram obtidos da Honeywell Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA) e J.T.Baker, USA, respectivamente. No preparo das soluções aquosas foi utilizado água purificada em sistema Milli-Q, modelo Plus system Millipore (Bedford, MA, USA). Para filtração da fase móvel aquosa foram utilizadas membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) e na fase móvel orgânica foi utilizado membrana de politetrafluoretileno (PTFE) (Millipore, Bedford, MA, USA), ambas com 0,22 µm de tamanho de poro.

Equipamentos

O conjunto UPLC-ESI-QToF MS utilizado consistiu de um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC Acquity Ultra Performance LC-Waters), composto por um sistema de bombeamento quaternário, sistema de injeção automática, associado por interface do tipo ionização por eletronebulização (ESI), a um espectrômetro de massas tipo (quadrupolo) "time-of-flight" (QToF MS) modelo Synapt. A aquisição de dados foi realizada mediante o programa computacional MassLynx versão 4.1. Todo o conjunto UPLC-ESI-QToF MS foi adquirido da Waters (Milford, MA, EUA).

Para o preparo de amostras utilizou-se os seguintes equipamentos: balança semianalítica Tecnal (Boulder, Co, USA); balança analítica modelo Scientech, SA 210 (Boulder, Co, USA); agitador de tubos tipo vortex, modelo MS1 minishaker, 2700 rpm, (Wilmington, USA); centrífuga refrigerada modelo Heraeus Multifuge 3L-R centrifuge, Thermo Scientific (Pittsburgh, USA); pipeta automática modelo Transferpette (0,5 - 5,0 mL) LRC 467; pipeta automática modelo Jencons Sealpette (200µL – 1000µL) LRC 26030/01 US; (Bridgeville, Pa, USA) banho de ultra-som modelo transsonic 660/H, Geprüfte Sichenheit (Singen, Germany); Processador doméstico de alimentos Waring, *Commercial Blender*, modelo 33BL79 (New Hartford, USA); Sistema Milli-Q, modelo Advantage A10 Millipore (Molshein, France); Turrax modelo IKA-works (Wilmington, USA);

Soluções padrões

Solução padrão estoque: foi preparada em acetonitrila na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dos seguintes padrões: (TMP, STZ, SMX, SMR, SMPD, SDMX, SP) e armazenadas em frascos de 10 mL e mantida em freezer a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta solução foi usada por um período máximo de 1 mês.

Soluções padrões intermediárias: estas foram preparadas diariamente por meio de uma diluição apropriada a partir da solução padrão de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Amostras de filé de tilápia

As amostras branco da matriz tilápia (*Oreochromis niloticus*) utilizadas para o estabelecimento das condições analíticas iniciais e no procedimento de validação do método analítico foram cedidas pela CAUNESP, Jaboticabal, SP.

Foi utilizado amostras branco da CAUNESP por se tratar de um centro de excelência em criação de peixes e por possuir matrizes de tilápia isentas dos fármacos estudados.

Preparo da amostra de filé de tilápia

Amostras de filé de tilápia foram trituradas utilizando-se um processador doméstico de alimentos.

Uma massa de 2,5 gramas de tilápia foi pesada em tubos de 50 mL de polipropileno. Adicionaram-se 5 mL de acetonitrila, para precipitação das proteínas, e os tubos foram homogeneizados usando-se um turrax, por 30 segundos. Em seguida, adicionaram-se mais 5 mL de acetonitrila e os tubos foram agitados vigorosamente em vortex por 1 minuto e procedeu-se o uso do banho de ultrassom por 5 minutos.

Procedimento de extração e *clean up* empregando a metodologia otimizada de extração QuEChERS

O solvente empregado na extração foi a acetonitrila pelo fato de ser seletivo para sulfonamidas (Liu, 2010) e pelo motivo de promover a precipitação das proteínas (Baptista,

2013). Assim, o uso da acetonitrila permite obter extratos mais limpos, com menor teor de coextrativos.

A extração empregando *salting out* foi realizada nas amostras de filé de tilápia preparadas, conforme descrito anteriormente. Foram adicionados 2,0 g de sulfato de magnésio anidro e 0,75 g de acetato de sódio e subsequente agitação vigorosa em vortex por 1 minuto. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 5 °C, por 10 minutos a 17.500 g.

Para a etapa de *clean up* pipetou-se volumetricamente uma alíquota de 5 mL do sobrenadante, o qual foi transferido para outro tubo contendo 150 mg de PSA e 0,5 g de sulfato de magnésio anidro. O tubo foi então agitado em vortex por 30 s a 1.700 rpm e centrifugado novamente a 5 °C, por 5 minutos a 17.500 g. Alíquota de 2 mL do sobrenadante foi pipetado volumetricamente para outro tubo e o solvente evaporado com nitrogênio em banho de gelo, por 120 minutos. Após a evaporação do solvente o resíduo foi resuspenso em 0,5 mL de fase móvel (acetonitrila : solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico, 95:5 v/v). Para facilitar a dissolução dos analitos, os tubos foram colocados em banho de ultrasson por 5 minutos. Por último, os extratos resultantes foram filtrados em unidades filtrantes de celulose com poros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore, EUA), diretamente no vial. Em seguida procedeu-se a injeção em sistema cromatográfico UPLC-ESI-QToF MS.

Condições cromatográficas

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna analítica de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 (50 x 2,1 mm, 2,7 µm) adquirida da Agilent Technologies (USA), precedida por uma pré-coluna de fase similar (30 x 2,1 mm, 2,7 µm). A temperatura de operação da coluna foi a temperatura ambiente (25 °C). O volume de injeção empregado foi de 5 µL e a vazão da fase móvel foi de 0,20 mL min⁻¹. A fase móvel aquosa (A) foi composta de H₂O: acetonitrila: ácido fórmico (95:5:0,1%, v/v/v). A fase móvel orgânica (B) foi composta de H₂O: acetonitrila: ácido fórmico (5:95:0,1%, v/v/v). A corrida foi executada no modo isocrático no tempo de 4 minutos na proporção de 70% A : 30% B.

Condições de ionização no sistema ESI-QToF MS

Para o sistema ESI-QToF MS (identificação e quantificação), foram estabelecidas as seguintes condições de ionização: foi usado o modo positivo de ionização na fonte *ES source*; voltagem do capilar: 2,5 kV; voltagem do detetor: 1.850 kV; voltagem do cone de amostra (*Sample Cone*): 20,0 V; voltagem do cone de extração (*Extraction Cone*): 2,0 V; a temperatura usada na fonte (*Source T*): 100 °C; a temperatura do gás de dessolvatação: 300 °C; o fluxo do gás de nitrogênio (N₂) no cone: 50 L h⁻¹ e na desolvatação: 400 L h⁻¹.

Validação do método analítico

O objetivo desta etapa é estabelecer os parâmetros de desempenho e os requisitos mínimos de aceitação que devem ser atendidos para que os procedimentos analíticos estabelecidos neste estudo sejam considerados validados. Para a realização da validação tomou-se como referência as recomendações da Comunidade Européia (EC, 2002) e do Guia para Validação de Métodos Analíticos do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (MAPA, 2011).

Depois de estabelecidas as condições analíticas para a determinação das sulfonamidas e do trimetoprim, procedeu-se a validação intra-laboratorial do método analítico. A validação foi executada com as sulfonamidas (STZ, SMX, SMR, SMPD, SDMX, SP, e SMZ), juntamente com o trimetoprim (TMP).

Os parâmetros de validação avaliados foram: seletividade; limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ); linearidade e sensibilidade; efeito matriz; precisão (intradia e interdias); exatidão; limite de decisão (CC α) e a capacidade de detecção (CC β).

A seletividade do método foi avaliada através da comparação dos cromatogramas das amostras branco e fortificadas. Nos cromatogramas obtidos foram verificados se havia a presença de compostos com tempo de retenção igual ou próximo ao tempo de retenção dos analitos de interesse. Foram realizadas análises de dez amostras branco (n=10) e dez amostras de matrizes fortificadas. O limite de detecção (LOD) é definido como sendo a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob

condições experimentais estabelecidas. Para cada uma das sulfonamidas e trimetoprim foi determinado o LOQ a partir do menor valor possível de concentração do analito na curva analítica, cujos valores atendam as especificações de linearidade ($r^2 > 0,99$) da curva analítica em questão.

A linearidade foi estabelecida a partir das curvas analíticas que foram obtidas pela análise em duplicata de amostras branco as quais foram adicionadas um volume conhecido de trimetoprim e sulfonamidas de forma a resultarem nas seguintes concentrações: 5 ng mL⁻¹, 12,5 ng mL⁻¹, 25 ng mL⁻¹, 50 ng mL⁻¹, 75 ng mL⁻¹, 100 ng mL⁻¹, 125 ng mL⁻¹ e 250 ng mL⁻¹. Os resultados obtidos foram analisados pelo método dos mínimos quadrados e a linearidade expressa como o coeficiente de correlação linear (r^2). O valor de referência adotado para assumir a linearidade é o de $r^2 \geq 0,99$ o qual é adotado pelo guia de validação do MAPA, 2011. O efeito matriz, que também é um estudo de seletividade, foi avaliado pela comparação de três diferentes concentrações (12,5 ng mL⁻¹, 50 ng mL⁻¹, 100 ng mL⁻¹) de sulfonamidas e trimetoprim preparadas em solvente e no extrato. A comparação é feita entre a área da concentração do analito em solvente com a área do analito adicionado no extrato. A precisão do método foi determinada em duas etapas: repetitividade (precisão intracorrída) e reprodutibilidade intralaboratorial (precisão intermediária).

A repetitividade foi expressa pelo coeficiente de variação (CV %) dos resultados de três níveis de concentrações diferentes em cinco replicatas de cada concentração, que foram analisadas no mesmo dia, pelo mesmo analista e usando o mesmo instrumento. A reprodutibilidade intralaboratorial foi expressa pelo CV dos resultados da análise de três concentrações diferentes (com cinco replicatas de cada concentração), realizadas em três dias diferentes (n=3), pelo mesmo analista e usando o mesmo instrumento.

A exatidão foi avaliada através de testes de recuperação da matriz fortificada em três níveis de fortificação (10,0; 20,0 e 40,0 ng mL⁻¹). Cada nível de fortificação foi avaliado usando cinco replicatas. Os resultados foram expressos como porcentagem das concentrações média fortificada na matriz em relação à concentração em solução padrão na mesma concentração.

Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ foram calculados utilizando os procedimentos da curva analítica matrizada, para o cálculo foi usado como referência o Guia de Validação da Comunidade Européia (EC, 2002). O limite de decisão ($CC\alpha$) é um termo usado pela

Comunidade Européia e depende de se a substância (medicamento veterinário) a ser analisada na matriz (alimento) possui um LMR. O limite de decisão é definido como o menor nível de concentração no qual o método pode discriminar com uma certeza estatística de $1-\alpha$ que o analito em questão está presente. Para as substâncias que apresentam LMR o valor de α é considerado 5%. Seu cálculo pode ser realizado pelo seguinte procedimento: analisar 20 amostras branco por matriz, fortificadas com o analito ao nível do LMR. A concentração do LMR mais 1,64 vezes o desvio padrão correspondente equivale ao $CC\alpha$ ($\alpha = 5\%$) (Paschoal, 2008).

A capacidade de detecção ($CC\beta$) representa a menor quantidade da substância que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada em uma amostra com uma probabilidade de erro aceitável (β). Para as substâncias que apresentam um LMR, a determinação $CC\beta$ pode ser realizada pelo seguinte procedimento: analisar 20 amostras branco por matriz, fortificadas com o analito no limite de decisão ($CC\alpha$). O valor de ($CC\alpha$) mais 1,64 vezes o desvio padrão correspondente equivale ao $CC\beta$ ($\beta = 5\%$); (Paschoal, 2008).

Resultados e discussão

Desenvolvimento da metodologia

Para o desenvolvimento da metodologia iniciamos nosso estudo com 15 sulfonamidas (SAM, SG, STZ, SIX, SMX, SMT, SDZ, SMR, SDD, SMPD, SDMX, SP, SQ, SSZ e SMZ) e o trimetoprim (TMP). O estudo preliminar foi iniciado com as sulfonamidas acima citadas pois estas são atualmente empregadas na criação de peixe no mundo (Lu, 2011; Pericás, 2010; Sapkota, 2008; Samanidou, 2007). Levando em consideração os testes de recuperação ($CV < 20\%$), foi possível selecionar os analitos (sulfonamidas e trimetoprim) usados na validação. As sulfonamidas selecionadas foram: STZ, SMX, SMR, SMPD, SDMX, SP, e SMZ; assim como também o trimetoprim (TMP). Dentre as sulfonamidas selecionadas temos SMZ, STZ e SDMX que são monitoradas pelo PNCRC-P (Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Peixes), no Brasil.

Estudo da metodologia de extração baseado na técnica QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)

Em 2003, Anastassiades *et al.* introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos de pesticidas denominado QuEChERS. A metodologia original utiliza como solvente de extração a acetonitrila, na proporção acetonitrila: amostra de (1:1). Assim, para cada 10 g de amostra usa-se 10 mL de acetonitrila. Considerado como método oficial para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos pela *Association of Official Chemists* (OAC) e pelo *European Committee for Standardization*, o método QuEChERS tem sido amplamente empregado na extração de multirresíduo de outros tipos de analitos como fármacos (Hashimoto, 2012; Krueve, 2009; Frenich, 2010).

Para análise de medicamentos veterinários, a partir de amostras de origem animal, a técnica D-SPE (*Dispersive Solid Phase Extraction*) que é a extração em fase sólida dispersiva e QuEChERS tem sido amplamente usada e principalmente para este propósito (Prestes, 2009; Capriotti, 2013).

Embora as técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas sejam muito sensíveis e seletivas, possíveis interferências causadas por elementos diversos que compõem a matriz amostral podem gerar fenômenos de supressão ou melhoria na ionização dos analitos de interesse, efeito este bastante significativo quando se utilizam fontes de ionização branda, como por exemplo, eletrospray (ESI). Este efeito é denominado efeito matriz (Queiroz, 2012; Lacina, 2010; Lehotay, 2010). Matrizes complexas podem influenciar a ionização do analito de interesse. Esta influência se dá na ionização do analito na fonte ESI. Este efeito não pode ser compensado por cálculos pelo fato de cada matriz ser única e influenciar de forma particular a ionização do analito (Krueve, 2008).

Estudos recentes demonstram que o método de extração do analito é da mais suma importância, uma vez que este pode apresentar maior ou menor efeito matriz. Este fato vai depender da eficiência da extração, quanto à capacidade deste método extrair o analito com o mínimo de interferentes possíveis. Acetonitrila tem sido amplamente utilizada na extração de analitos de matrizes complexas pelo fato de conseguir extrair analitos com baixo teor de interferentes. Isto é muito requerido uma vez que quanto menor o teor de interferentes

presentes na análise, menor o efeito matriz o que por sua vez leva a uma melhor qualidade final na análise (Kruve, 2008).

Kruve em 2009 publicou um trabalho que explora o combate ao efeito matriz em LC-ESI-MS através da utilização da diluição extrapolativa. Ele demonstra com diversos testes, através da metodologia QuEChERS de preparação de amostra, que a utilização de maior volume de acetonitrila para extração de analitos em matrizes complexas produz ótimos resultados em relação ao efeito matriz, pois o efeito matriz muda com a diluição. Sendo possível eliminar o efeito matriz com uma diluição adequada (Kruve, 2009). O presente estudo explora a extração de sulfonamidas e trimetoprim por meio da técnica QuEChERS através do uso da acetonitrila, por meio da diluição extrapolativa.

A acetonitrila foi escolhida devido a sua propriedade de ser seletiva para o analito. Durante a extração, a acetonitrila possibilita a extração de uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, pigmentos e gorduras (Prestes, 2009).

Estudos preliminares realizados demonstraram que para quantificação de sulfonamidas e trimetoprim em filé de tilápia a melhor proporção foi de acetonitrila:amostra (4:1, v/v), porque nesta proporção a quantidade de coextrativos era muito menor. E embora a quantidade de massa de amostra seja quatro vezes menor (foi usado 2,5 g de amostra), foi possível atingir um LOQ de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Dados da literatura demonstram que na quantificação de sulfonamidas o LOQ para SDZ é de $36 \mu\text{g kg}^{-1}$, em 5 g de amostra (Pericás, 2010). Stubbings & Bigwood, em 2009, apresentaram LOQ para SP, STZ, SMZ, SDMX, SMX, SMR de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, utilizando 5 g de amostra.

Estudo da massa de filé de tilápia e da utilização dos sais na etapa de *salting out*

A adição de sais para promover o efeito *salting out* tem sido utilizada em muitos métodos multirresíduos. Pois na etapa de partição é obtido melhores percentuais de recuperação para analitos com certa polaridade a polares, uma vez que aumenta a sua solubilidade na fase orgânica. Na metodologia original de extração QuEChERS é utilizado 4 g de MgSO_4 e 1 g de NaCl (Prestes, 2009). No desenvolvimento da metodologia para extração de sulfonamidas e trimetoprim em filé de tilápia foi utilizado 2 g de sulfato de

magnésio anidro e 0,75 g de acetato de sódio. A massa destes sais foi determinada através de testes preliminares os quais estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Estudo do uso de massa de filé de tilápia no método QuEChERS e da massa de sais empregados na etapa *salting out*.

Massa de filé de tilápia	Massa de Sulfato de magnésio	Massa de Acetato de sódio	Área pico Sulfaguanidina 100 ng g ⁻¹	Área pico Sulfametoxazole 100 ng g ⁻¹
1,0 g	1,0 g	0,75 g	-	-
2,5 g	1,0 g	0,75 g	1.677	119.590
2,5 g	2,0 g	0,50 g	1.588	169.732
2,5 g	2,0 g	0,60 g	1.920	181.563
2,5 g	2,0 g	0,75 g	2.020	197.352
5,0 g	2,0 g	0,75 g	1.223	88.841
5,0 g	5,0 g	1,50 g	1.717	174.496

Para a realização deste estudo foi utilizado o sulfametoxazole e a sulfaguanidina na concentração de 100 ng g⁻¹ de massa de tilápia.

Estudo dos sorventes da etapa de *clean-up*

O uso do PSA e/ou C₁₈ para o método de extração estudado, não apresentou variação significativa. Assim optou-se pela utilização do PSA já que este é usado comumente em outros métodos de extração QuEChERS. O motivo desta uniformidade de ação entre PSA e C₁₈ deve-se ao fato do teor de gordura no filé de tilápia ser baixo. Existem trabalhos em matrizes como patê, cujo teor de gordura é muito superior, o qual o uso de PSA e C₁₈ se faz necessário para uma melhor limpeza da amostra (Stubbings, 2009).

Validação do método desenvolvido

Testes preliminares de recuperação com as sulfonamidas e o trimetoprim que resultaram em valores inferiores de recuperação de 30 % e CV > 20%, como por exemplo para as sulfonamidas SAM, SG, SIX, SMT, SDZ, SDD, SP e SQ, é a razão pela qual estas não foram validadas. A validação procedeu para os analitos que obtiveram recuperação superior a 39,4 % e CV < 20 %. Assim, a validação foi executada com as sulfonamidas (STZ, SMX, SMR, SMPD, SDMX, SP e SMZ), juntamente com o trimetoprim (TMP).

O primeiro parâmetro avaliado foi a seletividade. A avaliação é feita através da comparação dos cromatogramas da amostra branco (Figura 5) com os cromatogramas da amostra de branco fortificadas (Figura 6) com as sulfonamidas e o trimetoprim. Conforme vemos abaixo nos cromatogramas, não foram verificados picos de compostos interferentes nos intervalos dos tempos de retenção dos analitos de interesse. Portanto, o método se apresentou satisfatoriamente seletivo.

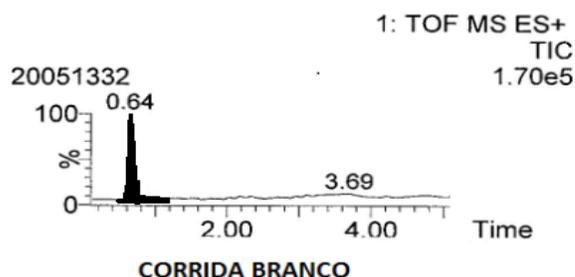


Figura 5, Cromatograma da amostra branco (sem adição de sulfonamida ou trimetoprim).

Foram analisadas 10 amostras de tilápias (cedidas pela CAUNESP), as quais não foram tratadas com sulfonamidas e trimetoprim. Foi inspecionado o cromatograma e não foi encontrado nenhum interferente no tempo de retenção correspondente às sulfonamidas ou ao trimetoprim.

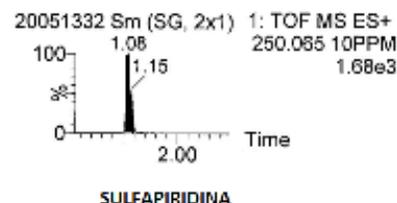
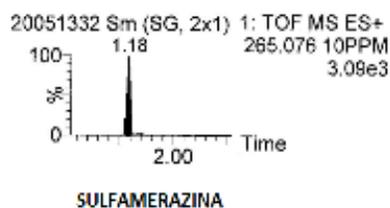
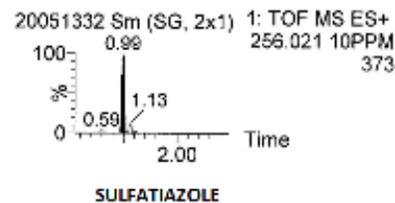
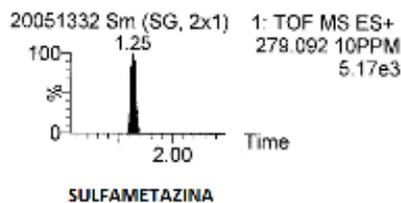
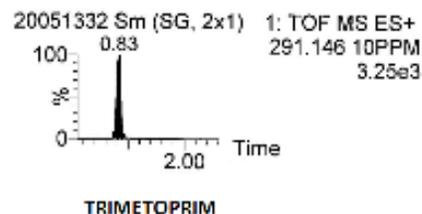
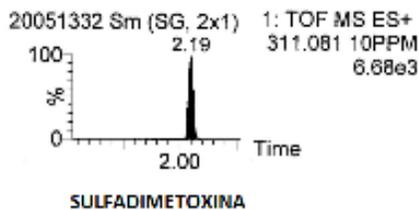
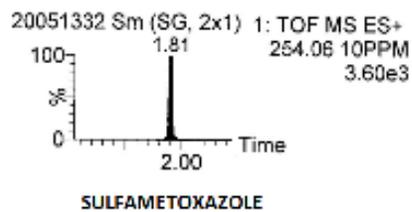
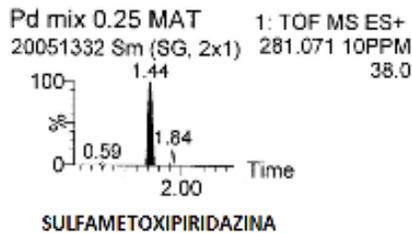


Figura 6. Cromatogramas extraídos das amostras branco fortificadas com as sulfonamidas e trimetoprim na concentração de 250 ng mL^{-1} .

As sulfonamidas, pelo fato de apresentarem um grupo sulfona ($-\text{SO}_2$) que possui característica fortemente eletronegativa, tendem a manter uma carga positiva no grupo amida ($-\text{R}-\text{NH}-\text{SO}_2$). Assim a amida dificilmente receberá outro hidrogênio. O grupo amina ($-\text{NH}_2$) possui maior facilidade de suportar uma carga positiva, até porque sua carga será estabilizada pelo grupo benzeno ao qual está ligada. Assim, quando utilizamos a técnica

ESI a protonação característica será no grupo amina ($-\text{NH}_3$)⁺. Na Tabela 3, podemos observar a fórmula molecular, massa molecular calculada pelo ToF, a massa (m/z) (M+H)⁺ das moléculas de sulfonamidas e os respectivos tempo de retenção de cada analito.

Tabela 3: Fórmula molecular, massa molecular calculada, massa do íon molecular e tempo de retenção das sulfonamidas e trimetoprim.

Analito	Fórmula molecular	Massa molecular teórica	Massa (m/z) [M+H] ⁺	Tempo de retenção (min)
Trimetoprim (TMP)	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290,1379	291,1460	0,83
Sulfapiridina (SP)	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	249,0572	250,0650	1,08
Sulfamerazina (SMR)	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	264,0681	265,0760	1,18
Sulfatiazole (STZ)	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	255,0136	256,0210	0,99
Sulfametazina (SMZ)	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	278,0837	279,0920	1,25
Sulfadimetoxina(SDMX)	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310,0736	311,0810	2,19
Sulfametoxazole(SMX)	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253,0521	254,0600	1,81
Sulfametoxipiridazina(SMPD)	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	280,0630	281,0710	1,44

Para avaliar o efeito matriz, que também é um estudo de seletividade, foram comparados os resultados obtidos das áreas do extrato fortificado com os analitos em solvente, nos níveis de concentração de 12,5; 50 e 100 ng mL⁻¹. O efeito matriz foi expresso em porcentagem calculado a partir da divisão entre os sinais obtidos para o analito no extrato fortificado e em solvente, no mesmo nível de concentração (Quesada, 2012). O maior valor de efeito matriz verificado foi de 18,98 %, o qual é inferior ao valor máximo recomendado (20 %) para os níveis de concentração estudados, indicando que a matriz apresenta uma interferência mínima na ionização dos analitos. Assim não foram verificados efeitos importantes de supressão ou ampliação do sinal analítico para o trimetoprim e as sulfonamidas estudadas.

A avaliação do LOQ e LOD é recomendada pelos guias de validação da FAO (1997), FDA (2001) e IUPAC (2002). Porém os guias de validação do MAPA (2011) e Comunidade Européia (2002) não fazem menção a este parâmetro na determinação de

resíduos de fármacos veterinários em alimentos. A avaliação do LOQ e LOD para a determinação de resíduos de sulfonamidas e trimetoprim em filé de tilápia foi executada tomando-se como base a curva analítica e a capacidade de detecção do equipamento. A determinação do LOQ foi baseada no menor valor de concentração de sulfonamidas e trimetoprim que permitia o estabelecimento das normas mínimas de validação. Ou seja é aquele valor que quando colocado na curva analítica ainda permita coeficiente de correlação mínimo de 0,99 e CV < 20% entre os valores medidos em replicatas de n = 6. O LOD foi determinado como sendo a concentração mínima detectada pelo equipamento, mas que já não possui coeficiente de correlação $r^2 > 0,99$ e apresenta CV > 20%. Ou seja é aquele valor mínimo de concentração do analito que o equipamento detecta, mas não quantifica.

Para o estudo do efeito matriz, da linearidade e sensibilidade, comparou-se os resultados analíticos dos níveis de concentração correspondente a 5 ng mL⁻¹, 12,5 ng mL⁻¹, 25 ng mL⁻¹, 50 ng mL⁻¹, 75 ng mL⁻¹, 100 ng mL⁻¹, 125 ng mL⁻¹, e 250 ng mL⁻¹ (8 níveis de fortificação), obtidos para os analitos no extrato fortificado e para os analitos no solvente. A título de exemplo, na figura 7 são apresentadas as curvas no solvente, extrato e matriz da sulfadimetoxina (SDMX). Como podemos observar a curva do solvente e a curva do extrato, possuem coeficientes angulares muito próximos. Assim, visualmente nota-se facilmente que o efeito matriz da curva do extrato em relação à curva do solvente é mínima. Quando comparamos estas curvas (no solvente e extrato) com a curva na matriz, nota-se que a inclinação (coeficiente angular) da curva na matriz é muito menor, o que indica perda do analito durante a etapa de preparo de amostra (extração e clean up).

Ao avaliar a linearidade do método das curvas analíticas em solvente, extrato fortificado e matriz fortificada verificamos coeficientes de correlação linear (r^2) superiores a 0.99, o que atende as recomendações do guia de validação do MAPA (2011) (Tabelas 4 e 5).

A sensibilidade é avaliada através do coeficiente angular da curva ($y = ax + b$). Quanto maior o coeficiente angular da curva, mais sensível é o método. Quando comparamos a curva em solvente com a curva no extrato e na matriz, notamos que o coeficiente angular da curva na matriz pode ser menor que o coeficiente angular das curvas

no extrato e no solvente (efeito matriz de supressão de sinal) ou maior (efeito matriz de ampliação do sinal), como para a sulfapiridina (SP) (Tabelas 4 e 5).

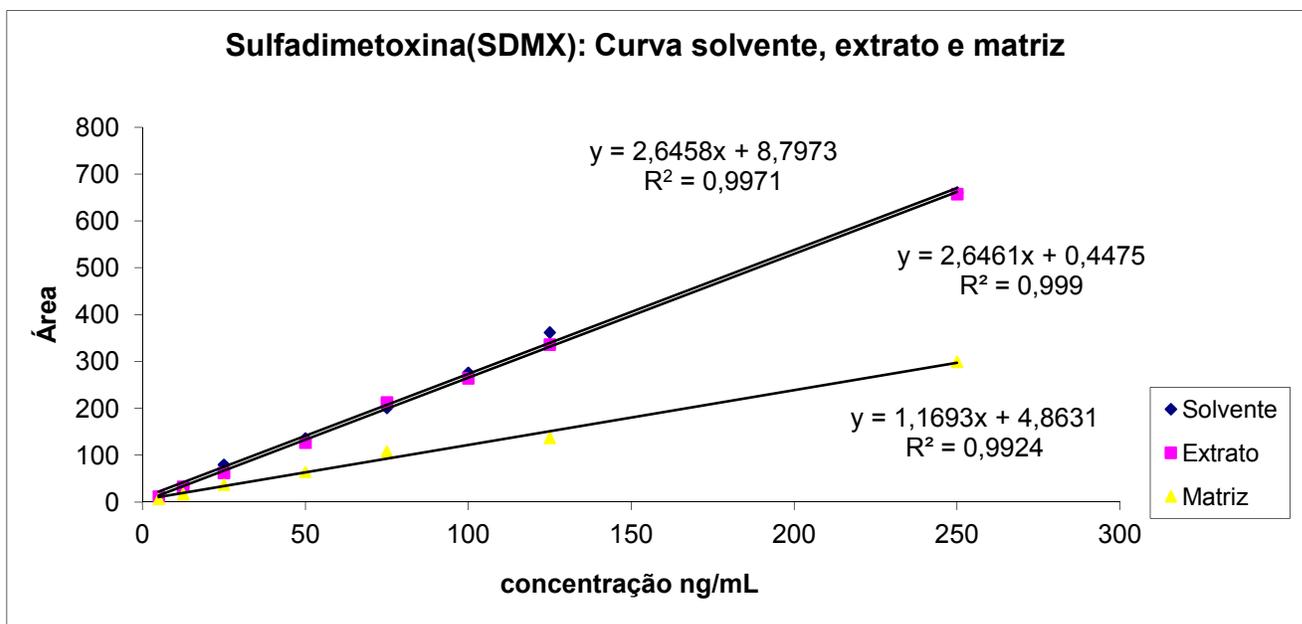


Figura 7: Exemplo de avaliação do efeito matriz, sensibilidade e linearidade por meio das curvas analíticas da sulfadimetoxina (SDMX) no solvente, extrato e matriz.

A exatidão foi avaliada a partir de ensaios de recuperação (%) a qual é sugerida pelos guias de validação (EC, 2002; MAPA, 2011). Sendo executada através do teste de recuperação da matriz fortificada em 3 níveis de fortificação (10, 20 e 40 ng g⁻¹). Os níveis de fortificação escolhidos foram os mais baixos da curva analítica e cada nível de fortificação foi avaliado utilizando 5 replicatas independentes em 3 dias. Foi escolhido o nível mais baixo da curva analítica para assegurar um CV < 20%, já que quanto menor a concentração maior é o erro devido a maior dispersão de resultados. Os analitos SP, SMR e TMP apresentam recuperação satisfatória (entre 70-110%). Os outros analitos (STZ, SMZ, SDMX, SMX e SMPD) apresentaram recuperações intermediárias (Tabela 5).

Tabela 4: Padrões sulfonamidas e trimetoprim: equação da curva, coeficiente de correlação linear (r^2) e coeficiente angular (a).

ANALITOS	SOLVENTE	EXTRATO	MATRIZ
SP	$A=1652,4x + 1,65649$ (r^2) = 0,9969 a= 1652,4	$A=1174,07x + 1,1386$ (r^2) = 0,9908 a= 1174,07	$A=1352,92x + -0,0514914$ (r^2) = 0,9950 a= 1352,92
SMR	$A=1484,67x + 2,1698$ (r^2) = 0,9962 a=1484,67	$A=1345,72x + 0,20584$ (r^2) = 0,9930 a=1345,72	$A=1112,74x + 5,21745$ (r^2) = 0,9927 a=1112,74
STZ	$A=1016,12x + 0,789388$ (r^2) = 0,9965 a=1016,12x	$A=633,811x + -0,519079$ (r^2) = 0,9909 a=633,811	$A=251,583x + -0,343001$ (r^2) = 0,9689 a=251,583
SMZ	$A=2024,95x + -5,77839$ (r^2) = 0,9930 a=2024,95	$A=2324,3x + 20,4185$ (r^2) = 0,9930 a=2324,3	$A=1641,46x + 24,3914$ (r^2) = 0,9845 a=1641,46
TMP	$A=6662,54x + 95,7854$ (r^2) = 0,9962 a=6662,54	$A=1588,92x + 3,92655$ (r^2) = 0,9913 a=1588,92	$A=1750,04x + 1,7474$ (r^2) = 0,9908 a=1750,04
SDMX	$A=2709,05x + 3,03535$ (r^2) = 0,9962 a=2709,05	$A=2670,56x + -1,51999$ (r^2) = 0,9988 a=2670,56	$A=1252,5x + 1,44549$ (r^2) = 0,9921 a=1252,5
SMX	$A=1600,71x + 1,49529$ (r^2) = 0,9971 a=1600,71	$A=1626,52x + -0,967161$ (r^2) = 0,9969 a=1626,52	$A=667,244x + 0,721253$ (r^2) = 0,9956 a=667,244
SMPD	$A=1916,39x + 3,30233$ (r^2) = 0,9942 a=1916,39	$A=2057,08x + 15,658$ (r^2) = 0,9957 a=2057,08	$A=1345,34x + 15,8449$ (r^2) = 0,9903 a=1345,34

A: área do analito na curva

a: coeficiente angular da curva

x: concentração do analito na curva

Tabela 5: Parâmetros de validação das sulfonamidas e trimetoprim

Parâmetros de validação	SULFONAMIDAS e TRIMETOPRIM							
	SP	STZ	SMZ	SDMX	SMX	SMPD	SMR	TMP
Faixa de trabalho (ng g ⁻¹)	5-250	5-250	5-250	5-250	5-250	5-250	5-250	5-250
Linearidade (r ²)	0,9958	0,9914	0,9922	0,9992	0,9994	0,9935	0,9964	0,9984
LOD (ng g ⁻¹)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
LOQ (ng g ⁻¹)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Efeito matriz (%)								
12,5 ng mL ⁻¹	-18,98	-2,07	-11,19	-3,58	-5,22	9,57	-3,68	9,65
50 ng mL ⁻¹	1,60	14,71	0,37	-3,28	1,13	-4,15	1,85	-0,12
100 ng mL ⁻¹	0,13	-7,02	0,46	1,61	-1,77	3,74	0,79	-0,03
Exatidão (% de recuperação)								
10 ng g ⁻¹	71,5-97,5	52,1-63,4	66,3-87,7	53,0-56,2	48,5-48,7	75,6-88,6	77,8-89,9	80,0-99,8
20 ng g ⁻¹	98,4-104,7	41,1-43,2	75,3-81,4	45,6-48,7	39,9-43,2	63,3-73,7	81,8-101,1	70,8-101,0
40 ng g ⁻¹	81,9-108,8	40,6-50,0	59,1-74,6	48,5-55,1	39,4-43,2	62,6-68,8	71,5-94,3	76,7-106,3

A determinação da precisão foi determinada em precisão intradia (repetibilidade) e interdias (precisão intermediária) em três níveis de fortificação e foram expressas como o coeficiente de variação (CV %).

A precisão intradias e interdias (Tabela 6) foram avaliadas nos níveis de concentração (10, 20, 40 ng mL⁻¹), com 5 replicatas em cada nível. Trabalhando nesta faixa de concentração, podemos garantir que a precisão e a exatidão nos pontos mais dispersivos tenha um CV < 20% nos níveis de maior concentração das matrizes fortificadas para cada nível de fortificação. Os níveis de concentração selecionados foram os níveis de menor concentração da faixa de trabalho estudada porque quanto menor a concentração do analito, maior será o seu coeficiente de variação (Baptista, 2013). A repetibilidade dos resultados de cada nível de fortificação, apresentados na Tabela 6, foram analisados no mesmo dia, com a mesma amostra e usando o mesmo equipamento. A precisão interdias (precisão intermediária) dos resultados das análises realizadas foi obtida a partir das mesmas análises realizadas com as amostras fortificadas para a obtenção da precisão intradia, porém o resultado foi expresso com o CV das médias calculadas a partir das triplicatas em cada um dos dias, durante 3 dias.

Para compostos com níveis de concentração inferior à 100 ng g⁻¹, o Guia de validação do MAPA (2011) e Comunidade Européia (EC, 2002) recomendam coeficiente máximo admitido de CV = 20%. Como podemos observar na Tabela 6, os parâmetros de validação (precisão intradia e precisão interdia) atendem as especificações recomendadas pelo MAPA, pois todos apresentam CV < 20 %.

Tabela 6. Parâmetros de CV em porcentagem (%) para Precisão intradia e Precisão Interdia.

Parâmetros de validação	SULFONAMIDAS e TRIMETOPRIM							
	SP	STZ	SMZ	SDMX	SMX	SMPD	SMR	TMP
Faixa de trabalho (ng g⁻¹)	5-250	5-250	5-250	5-250	5-250	5-250	5-250	5-250
Precisão Intradia (CV%)								
10 ng g⁻¹	12,8	11,7	11,6	7,7	6,4	7,1	11,3	8,3
20 ng g⁻¹	11,2	8,2	8,3	7,7	5,9	13,9	13,6	7,8
40 ng g⁻¹	12,9	14,9	15,0	12,3	7,9	6,1	14,5	10,6
Precisão Interdia (CV%)								
10 ng g⁻¹	14,4	19,2	19,4	17,8	11,9	9,4	15,4	13,2
20 ng g⁻¹	19,3	17,2	11,8	3,4	4,2	9,0	16,7	17,7
40 ng g⁻¹	19,0	18,6	19,1	4,5	10,0	5,5	15,0	16,2

O limite de decisão ($CC\alpha$) é um parâmetro que leva em consideração a precisão do método para um estabelecimento de um nível crítico de referência, a partir do qual pode-se concluir que uma amostra é classificada como não conforme, com uma probabilidade de erro de 5% ($\alpha = 5\%$). Porém, para que uma amostra não conforme possa ter sua concentração e sua identidades confirmadas com uma probabilidade de erro de 5% ($\beta = 5\%$), é calculado um outro parâmetro crítico denominado capacidade de detecção ($CC\beta$).

Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ obtidos para cada um dos analitos, através do método analítico estabelecido no presente estudo, são apresentados na Tabela 7. Considerando o LMR de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (EC, 2002) para sulfonamidas em peixes de criação com os resultados obtidos podemos concluir que o limite de decisão ($CC\alpha$) para as sulfonamidas varia de $102,6$ a $120,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para o trimetoprim, cujo LMR é de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (EC, 2002) o ($CC\alpha$) é de $70,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. Em relação a capacidade de detecção ($CC\beta$) para as sulfonamidas este valor variou entre $111,7$ e $140,1 \mu\text{g kg}^{-1}$; e para o trimetoprim o $CC\beta$ foi de $89,9 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 7: Valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ para sulfonamidas e trimetoprim em filé de tilápia.

Parâmetros de validação	SULFONAMIDAS e TRIMETOPRIM							
	SP	STZ	SMZ	SDMX	SMX	SMPD	SMR	TMP
Faixa de trabalho (ng g⁻¹)	5-250	5-250	5-250	5-250	5-250	5-250	5-250	5-250
Limite de decisão ($CC\alpha$) ng g⁻¹	119,8	110,9	114,0	102,6	102,9	105,9	120,0	70,0
Capacidade de detecção ($CC\beta$) ng g⁻¹	139,7	121,7	122,0	117,1	111,7	118,2	140,1	89,9

Conclusões

No presente estudo foi desenvolvido e validado um método analítico multirresíduo para a determinação de sulfonamidas STZ, SMX, SMR, SMPD, SDMX, SP, e SMZ; assim como também o trimetoprim (TMP) em filé de tilápia. Para tanto, a etapa de preparo de amostra foi baseada na metodologia QuEChERS e a detecção e quantificação realizada por UPLC-ESI-QToF MS. A faixa de trabalho foi de 5 a 250 ng g⁻¹ de matriz. A linearidade das curvas (r^2) se apresentaram acima de 0,99; o método apresentou LOD de 1 ng g⁻¹ e LOQ de 5 ng g⁻¹. Os coeficientes de variação (CV %) para precisão intradia e interdia se apresentaram abaixo de 20 %, em conformidade com o Guia de Validação do MAPA (2011). O método analítico desenvolvido e validado é simples e fácil de trabalhar, permitindo a realização de um número grande de análise de rotina. Assim, é adequado para o monitoramento, no filé de tilápia, da presença de trimetoprim e das sulfonamidas estudadas, podendo ser de valia para as agências governamentais responsáveis pela realização desse tipo de análise.

Referências bibliográficas

- Annex I of Council Regulation (EEC) No. 2377/90. List of pharmacologically active substances for which maximum residue levels have been fixed.* Disponível em: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf, acessado em 02/2013.
- Annex to Commission Regulation (EU) No 37/2010, pagina L15/63* <http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf > MRL sulfonamidas, acesso 04/02/2013.
- ANVISA. 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29/05/2003, Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm >. Acessada em 07/2012.
- ANVISA. 2013. Mecanismo de ação das sulfonamidas e trimetoprim na célula bacteriana. ANVISA; Antimicrobianos, principais grupos disponíveis para uso clínico; Sulfonamidas; http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/pop_mecanismo.htm
- Baptista, R. C.; Moxidectina no Soro de Cordeiros: Perfil Farmacocinético e Avaliação de seus Resíduos em Diferentes Métodos de Controle Parasitário. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2013.
- Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura (Brasil 2010) <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf> acessado 02/2013.
- CAS Chemical Abstracts Service.< <http://www.cas.org/content/regulated-chemicals>> acessado 02/2013.
- Capriotti, A.L.; Cavaliere, C.; Lagana, A.; Piovesana, S.; Samperi, R.; Recent trends in matrix solid-phase dispersion. **Trends in Analytical Chemistry**. V. 43, p.53-66, 2013.
- De Bradander, H.F.; Noppe, H.; Verheyden, K.; Bussche, J.V.; Wille, K.; Okerman, L.; Vanhaecke, L.; Reybroeck, W.; Ooghe, S.; Croubels, S.; Residue analysis: Future

- trends from a historical perspective. *Journal of Chromatography A*. V. 1216, p. 7964-7976, 2009.
- EC-2002 *Commission Decision* 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities, L221. 8.**
- EMEA/MRL/828/02- FINAL(The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Inspections) 2002. Committee for Veterinary Medicinal Products (Trimetoprim).
<http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015682.pdf> Acesso 04/02/2013.
- FAO. (1997). Towards safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture. GESAMP Reports and Studies No. 65, Roma. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/meeting/003/w6435e.htm>.
- FAO.2005. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Responsible use of antibiotics in aquiculture. Disponível em: <<http://tp.fao.org/docrep/fao/009a0282e/a0282e00.pdf>> acessado em 08/2012
- FAO.2013. Yearbook 2010 Fishery and Aquaculture Statistics <http://www.fao.org/fi/website/MultiQueryAction.do> acessado em 02/2013.
- Frenich, A.G.; Aguilera-Luiz, M.M.; Vidal, J.L.M.; Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. V.661, p. 150-160, 2010.
- Gandara, S.M.; Desenvolvimento e Validação de Método Analítico Utilizando LC-MS/MS para Determinação de Macrolídeos em Carne de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).Campinas, 77 p., 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
- Hajslová, J.; Zrostlíková, J.; Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**. V. 1000, p. 181-197, 2003.
- Harikrishnan, R.; Balasundaram, C.; Heo, M.; Fish health aspects in grouper aquaculture. **Aquaculture**, v.320, p. 1-21, 2011.

- Hashimoto, J.C.; Pascoal, J. A simple method for the determination of malachite green and leucomalachite green residues in fish by a modified QuEChERS extraction and HPLC/MS/MS. **Journal of AOAC International**. V.95 (3), p. 1-10, 2012.
- Hoff, R. Análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas. Porto Alegre, 129p.; 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande de Sul.
- IUPAC, 2002 UNIÃO INTERNACIONAL DE QUÍMICA PURA E APLICADA: Compendium of Chemical Terminology- Gold Book, Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>>. Acessada em 08/2012.
- JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants). <http://jcfai.ilsa.org/section1.htm> , Acesso em 07/2012.
- Juanjuan Liu; Jiang M.; Li, G.; Xu, L.; Xie, M.; Miniaturized salting-out liquid-liquid extraction of sulfonamides from different matrices. **Analytica Chimica Acta**. no. 679, p. 74-80, 2010.
- Kruve, A.; Kunnapas, A.; Herodes, K.; Leito, I.; Matrix effects in pesticide multiresidue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. V. 1187, p. 58-66, 2008.
- Kruve, A.; Leito, I.; Herodes, K.; Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. **Analytica Chimica Acta**. V. 651, p. 75-80, 2009.
- Lacina, O.; Urbanova, J.; Poustka, J.; Hajslova, J.; Identification/quantification of multiple pesticide residues in food plants by ultra-high-performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. V. 1217 (5), p. 648-659, 2010.
- Lehotay, S. J.; Mastovska, K.; Lightfield, A.R.; Gates, R.A.; Multi-Analyst, Multi-Matrix Performance of the QuEChERS Approach for Pesticide Residues in Foods and Feeds Using HPLC/MS/MS Analysis with Different Calibration Techniques. **Journal of AOAC International**. V.93 (2), p. 355-367, 2010.
- Liu, J.; Jiang, M.; Li, G.; Xu, L.; Xie, M.; Miniaturized salting-out liquid-liquid extraction of sulfonamides from different matrices. **Analytica Chimica Acta**. V. 679, p. 74-80, 2010.

- Lopes, R. P.; Passos, E. E. F.; Filho, J. F. A. ; Vargas, E. A.; Augusti, D.V.; Augusti, R.; Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis. **Food Control**, no. 28, p. 192-198, 2012.
- Lu, Y.; Shen, Q.; Dai, Z.; Zang, H.; Wang, H.; Development of an on-line matrix solid-phase dispersion/fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry system for the rapid and simultaneous determination of 13 sulfonamides in grass carp tissues. **Journal of Chromatography A**. v. 1218, p. 929-937, 2011.
- MAPA, 2011. Guia de validação e controle de qualidade analítica. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Guia%20de%20valida%C3%A7%C3%A3o%20e%20controle%20de%20qualidade%20analitica.pdf> acessado em: 02/2013.
- MAPA, PNCRC, 2009. Instrução Normativa no. 15, de 25 de maio de 2009. <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2015-2009.pdf>. Acessado 20/08/2013.
- M sagati, T. A. M.; Nindi, M. M.; Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. **Talanta**, no. 64. p.87-100, 2004.
- Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos. MAPA, Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Disponível em Acesso em 26/11/2012.
- Marazuela, M. D.; Bogialli, S.. A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. **Analytica Chimica Acta**. V. 645, p. 5-17, 2009.
- Marques, B. Sulfonamidas: As substâncias indicadas para tratamento e prevenção de infecções intestinais e respiratórias, artrites, pododermatites, mastites e metristes, meningoencefalites e infecções urinárias. Disponível em: <http://www.formilvet.com.br/pork59_sanidade.pdf> acessado em 03/2013.
- MPA, 2012 (Ministerio da Pesca) <http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura> , acessado em 02/2013.

- Nonaka, C.K.V.; Oliveira, A.M.G.; Paiva, C.R.; Almeida, M.P.; Resende, C.P.; Moraes, C.G.O.; Botelho, B.G.; Souza, L.F.; Dias, P.G.; Occurrence of antimicrobial residues in Brazilian food animals in 2008 and 2009. **Food Additives and Contaminants**, v.29, no. 4, p. 526-534, April 2012.
- Paschoal, J.A.R.; Rath, S.; Airoidi, F.P.S.; Reyes, F.G.R.; Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**. Vol 31, no. 5, 2008.
- PNCR -Anexo I - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. Disponível em: http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/establecimientos_habilitados_exportar/normativa/Brasil/progr_control_res_productos.pdf, Acessado em 02/2013.
- Pecorelli, I.; Bibi, R.; Fiorino, L.; Galarini, R.; Validation of a confirmatory method for determination of sulphonamides in muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**. V.1032, p. 23-29, 2004.
- Pericás, C. C.; Maquieira, A.; Puchades, R.; Company, B.; Miralles, J.; Multiresidue determination of antibiotics in aquaculture fish by HPLC-MS/MS. **Aquaculture Research**. V. 41, p. e217-e225, 2010.
- Prestes, O. D.; Friggi, C.A.; Adaime, M. B.; Zanella, R.; QuEChERS- Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quim. Nova**. Vol.32, Nº 6, p. 1620-1634, 2009.
- Queiroz, S.C.N.; Ferracini, V. L.; Rosa, M.A.; Multiresidue method validation for determination of pesticides in food using QuEChERS and UPLC-MS/MS **Química Nova**. Vol.35, Nº 1, p. 185-192, 2012.
- Quesada, S. P.; TESE: Desenvolvimento e validação de método analítico empregando LC-MS/MS QtoF para a determinação de fluoroquinolonas em peixes. 2012.
- Reig, M.; Toldrá, F.; Liquid Chromatography for the rapid screening of growth promoters residues in meat. **Food Anal. Methods**. V. 1, p. 2-9, 2008.
- Rendal, C.; Kusk, K.O.; Trap, S.; Optimal choice of pH for toxicity and bioaccumulation studies of ionizing organic chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol 30, no. 11, p. 2395-2406, 2011.

- Samanidou, V. F.; Evaggelopoulou, E. N.; Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish. **J. Sep. Sci.** v. 30, p. 2549-2569, 2007.
- Sapkota, A.; Sapkota, A. R.; Kucharski, M.; Burke, J.; Mckenzie, S.. Aquaculture practices and potencial human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International.** v 34, p. 1215-1226, 2008.
- Sanli. S.; Altun, y.; Sanli, N.; Alsancak, G.; Beltran,J.L.. Solvent Effects on pKa Values of Some Substitued Sulfonamides in Acetonitrile-Water Binary Mixtures by the UV-Spectroscopy Method. **J.Chem.Eng. Data.** V 54, pg. 3014-3021, 2009.
- Stubbings, G.; Bigwood, T.. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach. **Analytica Chimica Acta,** V. 637, p. 68-78, 2009.
- Torres,C.; Moreno, M.A.; Zarazaga, M. Prudent use of antimicrobial agents: Not just humans. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clínica.**v. 28(10), p.669-671, 2010.
- Turnipseed, S. B.; Clark,S.B.; Storey, J. M.; Carr, J. R.; Analysis of Veterinary Drug Residues in Frog Legs and Other Aquaculture Species Using Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. **J. Agric. Food Chem.** V. 60, pg. 4430-4439, 2012.
- Wang, S.; Zhang, H. Y.; Wang, L.; Duan, Z. J.; Kennedy, I.; Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. **Food Additives an Contaminants.** V. 23(4), p. 362-384, 2006.
- Wenhui Li; Yali Shi; Gao,L.; Liu, J.; Cai,Y.; Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. **Chemosphere.** V. 89, p.1307-1315, 2012.
- Zhang, W.; Duan, C.; Wang, M.; Analysis of seven sulphonamides in milk by cloud point extraction and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry.** V.126, P. 779-785, 2011.

CONCLUSÃO GERAL

A segurança do alimento é um tema amplamente discutido e cada vez com maior relevância mundial. Métodos de análise de resíduos têm sido desenvolvidos nos últimos anos com o intuito de prover meios de monitoramento de resíduos de substâncias químicas.

Os fármacos empregados na criação de animais destinados a produção de alimentos estão entre os produtos que podem contribuir com a presença de resíduos químicos no produto final. Assim o desenvolvimento de métodos analíticos destinados a identificação e quantificação destes resíduos é de fundamental importância para a saúde dos consumidores.

Dentre os produtos de origem animal destinados ao consumo humano, os produtos derivados de animais aquáticos tem ganhado grande relevância mundial, com destaque para a aquicultura, na criação de peixes.

As sulfonamidas e o trimetoprim são antibióticos amplamente utilizados na criação de animais de todos os tipos, inclusive na aquicultura, para fins profiláticos (prevenção de doença) e terapêuticos (tratamento de doença).

Este estudo teve por objetivo avaliar resíduos de sulfonamidas e trimetoprim em filés de tilápia de criação. O trabalho avaliou o método de extração QuEChERS modificado com o método de detecção e quantificação UPLC-ESI-QToF MS. Ambos os métodos de extração e detecção/quantificação mostraram-se robustos para a análise de sulfonamidas e trimetoprim em filé de tilápias.

As análises empregando estes métodos demonstraram alta capacidade de detecção e quantificação de resíduos com limites inferiores aos limites definidos nas legislações nacionais e internacionais de controle de resíduos em produtos alimentares de origem animal.

Estes resultados mostraram que os métodos são bastante simples e eficazes na determinação de resíduos em matrizes complexas e por isso, poderiam ser expandidos para aplicação de análise de outros tipos de resíduos em diferentes matrizes de origem animal. Estes métodos também podem ser indicados para processos de controle de qualidade ou monitoramento da qualidade dos produtos com relação a presença de resíduos de fármacos.