UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Nelson Miguel Grubel Bandeira

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM SALMÃO POR UHPLC-MS/MS

Santa Maria, RS.

2019

Nelson Miguel Grubel Bandeira

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM SALMÃO POR UHPLC-MS/MS

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências**.

Orientador: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

Santa Maria, RS
2019

Bandeira, Nelson Miguel Grubel
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM SALMÃO POR UHPLC-MS/MS / Nelson Miguel Grubel Bandeira.- 2019.
166 p.; 30 cm

Orientador: Osmar Damian Prestes
Coorientador: Renato Zanella
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2019

1. planejamento de experimentos 2. aquicultura 3. extração sólido-líquido I. Prestes, Osmar Damian II. Zanella, Renato III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Nelson Miguel Grubel Bandeira

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM SALMÃO POR UHPLC-MS/MS

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências**.

Aprovado em 27 de fevereiro de 2019:

Osmar Damian Prestes, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Fábio Ferreira Gonçalves, Dra. (FURG)

Cristiano Augusto Ballus, Dr. (UFSM)

Jaqueline Ineu Golombieski, Dra. (UFSM)

Liziara Cabrera, Dra. (UFFS)

Santa Maria, RS
2019

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM SALMÃO POR UHPLC-MS/MS

AUTOR: Nelson Miguel Grubel Bandeira
ORIENTADOR: Osmar Damian Prestes

A indústria aquícola vem crescendo, se desenvolvendo e se destacando ao longo dos ultimos anos. Muitos países e organizações internacionais tem investido no desenvolvimento da atividade de acordo com os recursos disponíveis. O Chile se destaca no mercado mundial no que diz respeito a produção de salmão (*Salmo salar*) sendo principal fornecedor do produto para o Brasil. Os medicamentos veterinários podem ser utilizados durante o processo produtivo visando o manejo adequado e a prevenção de prejuízos financeiros. Uma vez administrados, os medicamentos veterinários podem ser absorvidos e permanecer na carne dos peixes na forma de resíduo. Muitos medicamentos são proíbidos para uso veterinário, muitos outros são autorizados e exigem aplicação, acompanhamento e período de carência adequado para não deixar resíduos no produto final. A prensença de resíduos de medicamentos é de grande preocupação uma vez que pequenas doses, administradas diariamente, podem levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana. O monitoramento da presença de resíduos pode ser realizado através de programas e regulamentações. A determinação da presença de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal é realizada através de métodos analíticos seguros e confiáveis. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método analítico para determinação de resíduos de nitroimidazóis, quinolonas, tetraciclinas, anfenicóis, sulfonamidas, macrolídeos, piretróides e benzamidas em salmão (*Salmo salar*) utilizando UHPLC-MS/MS. Para desenvolvimento do método ensaios para avaliação dos solventes utilizados na extração e sorventes utilizados na etapa de preparo de amostra foram realizados. As condições do sistema UHPLC-MS/MS, como composição da faz móvel, coluna de separação, gradiente de eluição da fase móvel, vazão da fase móvel, temperatura do gas de dessolvatação e tensão aplicada ao capilar também foram avaliadas. O método teve como etapa de preparo de amostra extração com acetonitrila e limpeza de extrato utilizando SPE. A etapa de determinação foi realizada em sistema UHPOLC-MS/MS Xevo TQ®. A fase móvel utilizada foi solução aquosa e acetonitrila, ambos 0,1% ácido fórmico (v/v) na vazão de 100 µL min^{-1}no modo gradiente. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Acquity HSST3 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm) à 60 °C. O volume de injeção foi de 10 µL. As condições da fonte de ionização (ESI) foram temperatura do gás de dessolvatação de 600 °C, tensão do capilar de 2000 V, temperatura da fonte 150 °C. A validação do método desenvolvido foi realizada com base nos documento CD/657/EU e SANTE, 2017. Os resultados de recuperação variaram entre 71 e 120% com desvios menores do que 24%. Os limites de quantificação alcançados variaram entre 5 e 25 µg kg^{-1}. Efeitos de matriz foram em sua maioria negativos variando entre -45 e -22%. O método foi aplicado na análise de 15 amostras reais. O método é adequado para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em laboratórios de rotina para 5 das classes em estudo dentro dos limites estabelecidos pela legislação.

Palavras-chave: planejamento de experimentos, aquicultura, extração sólido líquido

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF VETERINARY DRUG RESIDUES IN SALMON BY UHPLC-MS/MS

AUTHOR: Nelson Miguel Grubel Bandeira
ADVISOR: Osmar Damian Prestes

The aquaculture industry has been growing, developing and highlightning in the last few years. Many countries and international organizations have invested in developing the activity according to available resources. Chile stands out in the world market in salmon production (*Salmo salar*) being the main supplier of the product to Brazil. Veterinary drugs may be used during the production process for the proper management and prevention of financial losses. Once administered, veterinary drugs can be absorbed and remain in fish meat as residues. Many drugs are banned for veterinary use, many others are authorized and require application, attendance and appropriate withdrawal period to not leave residues in the product. The presence of drug residues is of great concern, since small doses given daily can lead to the development of bacterial resistance. Monitoring of the presence of residues can be carried out through programs and regulations. The presence of residues of veterinary drugs in products of animal origin is determined by reliable and suitable analytical methods. Therefore, the objective of this work was to develop an analytical method for the determination of residues of nitroimidazoles, quinolones, tetracyclines, amphenicoles, sulfonamides, macrolides, pyrethroids and benzamides in salmon (*Salmo salar*) using UHPLC-MS/MS. The development of the method was performed by assays for evaluation of the solvents used in the extraction and sorbents used in the sample preparation step. The conditions of the UHPLC-MS/MS system, such as mobile fase composition, chromatographic column, mobile phase elution gradient, mobile phase flow rate, desolvation gas temperature and tension applied to the capillary were also evaluated. The method of sample preparation was based on the extraction with acetonitrile and clean up step using SPE. The determination step was performed in UHPLC-MS/MS Xevo TQ® system. The mobile phase used was aqueous solution and acetonitrile, both 0.1% formic acid (v/v) at the flow rate of 0.1 mL min^{-1} in gradient mode. The chromatographic column used was an Acquity HSST3 (50 x 2.1 mm, 1.8 µm) at 60 ° C. The injection volume was 10 µL. The conditions of the ionization source (ESI) were desolvation gas temperature of 600 °C, capillary voltage of 2000 V, source temperature 150 °C. The validation of the method developed was based on documents CD/657/EU and SANTE, 2017. The results of recovery varied between 71 and 120% with deviations less than 24%. The quantification limits ranged from 5 to 25 µg kg^{-1}. Matrix effects were mostly negative ranging from -45 to -22%. The method was applied in the analysis of 15 real samples. The method is suitable for the determination of residues of veterinary drugs in routine laboratories for 5 of the classes under study within the limits established by the legislation.

Palavras-chave: design of experiments, aquaculture, solid liquid extraction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Perfil de importações de salmão no Brasil entre janeiro de 2012 e abril de 2017 21
Figura 2 – Ciclo de produção de salmão em cativeiro 24
Figura 3 – Estruturas químicas dos compostos cloranfenicol (A), tianfenicol (B) e florfenicol (C) 28
Figura 4 – Estrutura química dos compostos eritromicina (A), tilmicosina (B) e tilosina (C). 29
Figura 5 – Estrutura química dos compostos metronidazole (A), dimetridazole (B) e ronidazole (C) 31
Figura 6 – Estruturas químicas dos compostos ácido oxolínico (A), sarafloxacina (B), danofloxacina (C), difloxacina (D) e enrofloxacina (E) 32
Figura 7 – Estruturas químicas dos compostos clortetraciclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C) 34
Figura 8 – Estruturas químicas das principais sulfonamidas. 36
Figura 9 – Estrutura química do trimetoprim 37
Figura 10 – Estrutura química dos compostos dilfubenzuron (A) e teflubenzuron (B) 39
Figura 11 – Perfil da curvatura dos gradientes de eluição da fase móvel orgânica utilizados para avaliação da resolução cromatográfica dos compostos em estudo. . 74
Figura 12 – Área relativa (à maxima obtida no ensaio) em função da composição da fase móvel de acordo com a Tabela 8 (item 4.4.3) para o composto cloropiridazina 92
Figura 13 - Área relativa (à maxima obtida no ensaio) em função da composição da fase móvel de acordo com a Tabela 8 (item 4.4.3) para o composto teflubenzuron . 93
Figura 14 – Moda dos ensaios de fase móvel presentes entre as 5 melhores para os compostos em estudo (de acordo com a Tabela 8). 93
Figura 15 – Cromaogramas do ion total obtido pelo sistema UHPLC-MS/MS para o composto oxitetraciclina para os gradientes 1 e 2 nas colunas avaliadas. 96
Figura 16 – Diagrama de médias marginais mostrando a influência da vazão da fase móvel na intensidade do sinal analítico (área) para o composto dimetridazol 100
Figura 17 – Resultados de recuperação (%) para avaliação da etapa de extração de amostras de salmão utilizando os métodos QuEChERS Original, Acetato e Citrato. 104

Figura 18 - Resultados de recuperação (%) para avaliação da etapa de extração de amostras utilizandos os métodos QuEChERS adaptados para medicamentos veterinários D e E 107
Figura 19 – Recuperações obtidas utilizando duas combinações de solventes de extração durante etapa de preparo de amostra 110
Figura 20 – Recuperações obtidas utilizando água (verde) acetonitrila (vermelho) e acetonitrila:água (8:2, v/v) 112
Figura 21 – Cromatogramas obtidos para o perfil de fosfolipídeos de extratos de amostras de salmão submetidos a diferentes procedimentos de limpeza 115
Figura 22 – Cromatograma SRM de uma solução padrão na concentração de 50 μg L^{-1} de uma amostra “branco” de salmão fortificada. 117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites máximos de resíduos estabelecidos pela União Europeia para produtos de origem aquicultura para os compostos em estudo. 43
Tabela 2 – Revisão de métodos de homogeneização, solventes, pH de extração, solução tampão, agentes complexantes e sais de partição utilizados no preparo de amostras de peixes para determinação de resíduos de medicamentos veterinários 49
Tabela 3 – Volumes de injeção, colunas, temperaturas da coluna, fase móvel, vazão e tempo total de análise cromatográfica aplicadas na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de peixe. 58
Tabela 4 – Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas 64
Tabela 5 – Gradiente de eluição da fase móvel utilizado para determinação de resíduos de medicamentos veterinários por UHPLC-MS/MS para fase móvel aquosa (A) e orgânica (B) 68
Tabela 6 - Transições SRM utilizadas na determinação dos resíduos de medicamentos veterinários no sistema UHPLC-MS/MS, massa molar (MM), modo de ionização (ESI +/-), razões massa/carga (m/z) utilizadas para os íos precursor e produtos, energia do cone (V) e energia de colisão (eV). 69
Tabela 7 – Ensaios realizados para avaliação das condições de fase móvel para determinação de resíduos de medicamento veterinário no sistema UHPLC-MS/MS. 71
Tabela 8 – Gradientes de eluição da fase móvel utilizados para avaliação da resolução cromatográfica dos compostos em estudo 72
Tabela 9 – Ensaios realizados para otimização das condições da fonte de ionização ESI variando as condições de tensão do capilar, temperatura do gás de dessolvatação e vazão da fase móvel. 75
Tabela 10 – Métodos cromatográficos utilizados para determinação por UHPLC-MS/MS para cada um dos compostos em estudo. 77
Tabela 11 – Variações de quantidade de amostra, solvente de extração e sais de partição utilizadas no método QuEChERS.....81

Tabela 12 – Experimentos realizados através do planejamento 3^2, para otimização das concentrações de ácido tricloroacético e EDTA utilizados na etapa de extração 83
Tabela 13 – Analitos avaliados durante o desenvolvimento do método de separação e determinação por UHPLC-MS/MS em termos de limite de quantificação (LOQ) e coeficiente de determinação (r^2).....89
Tabela 14 - Avaliação dos formatos de pico para os compostos em estudo nos gradientes de eluição 1 e 2 em cada uma das coluna cromatográficas avaliadas. ...97
Tabela 15 – Efeitos obtidos no diagrama de pareto para cada uma das variáveis lineares e quadráticas, exceto tensão do capilar(Q). 98
Tabela 16 – Estimativa dos efeitos padronizados para percentagem de TCA e concentração de EDTA e suas interações lineares (L) e quadráticas (Q).....108
Tabela 17 – Resultados de recuperação (%), desvio padrão relativo (%) para precisão e precisão intermediária, LOD (µg kg^{-1}), LOQ (µg kg^{-1}), CCα (µg kg^{-1}), CCβ (µg kg^{-1}), efeitos de matriz (%) e razão entre íons de identificação e quantificação.....118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABN – ácidos, básicos e neutros, SPE polimérico avançado para analitos (do inglês, *acidics, basic and neutral analytes, advanced polymeric SPE for*);

ANOVA – Análise da variância (do inglês*, analysis of variance*);

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

AOAC – Associação Oficial de Químicos Analíticas (do inglês, *Association of Official Analytical Chemists*);

BEH – Híbrido com pontes de etileno (do inglês, *ethylene bridged hybrid*);

C18 – Octadessilsilano;

CCRVDF – Comitê do Codex sobre resíduos de medicamentos veterinários em alimentos (do inglês, *Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods*);

CCα – Limite de decisão (do inglês, *limit od decision*);

CCβ – Capacidade de detecção (do inglês, *detection capability*);

DNA - ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*);

d-SPE – Extração em fase sólida dispersiva (do inglês, *dispersive solid phase extraction*);

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*);

EMR – Remoção aprimorada de matriz (do inglês, *enhanced matrix removal*);

ESI – Ionização por Eletronebulização (do inglês, *electrospray ionization*);

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*);

HLB – Equilíbrio hidrofílico-lipofílico (do inglês, *hydrophilic lipophilic balance*);

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*);

HSS T3 – Sílica de alta resistência com ligação trifuncional (do inglês, *high strength silica trifunctional bonded*);

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;

IEC – Comissão Eletrotécnica Internacional (do inglês, *International Electrotechnical Commission*);

Inmetro – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia;

ISO – Organização Internacional de Normalização (do inglês, *International Organization for Standardization*);

JECFA – Comitê Conjunto de Especialistas da FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares (do inglês, *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*);

LARP – Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas;

LMDR – Limite mínimo de desempenho requerido;

LMR – Limite máximo de resíduo;

LOD – Limite de detecção (do inglês, *limit of detection*);

LOQ – Limite de quantificação (do inglês, *limit of quantification*);

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento;

MS – Espectrometria de massas (do inglês, *mass spectrometry*);

MS/MS – Espetrometria de Massas em Série (do inglês, *tandem mass spectrometry*);

PBS-T – Solução salina de tampão fosfato com Tween 20 (do inglês, *phosphate buffer saline*);

pH – Potencial hidrogeniônico;

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes;

PP – Polipropileno;

PSA; Amina primária secundária (do inglês, *primary secondary amine*);

PTFE – Politetrafluoretileno;

PVDF – Fluoreto de polivinilideno (do inglês, *polivinidene fluoride*);

QuEChERS – rápido, fácil, , econômico, efetivo, robusto e seguro (do inglês, *quick, easy, cheap, enhanced, rugged and safe*);

RASFF – Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (do inglês, *Rapid Alert System for Food and Feed*)

RSD – Desvio padrão relativo (do inglês, *relative standard deviation*);

SIF - Serviço de Inspeção Federal;

SLE – Extração Sólido-líquido (do inglês, *solid liquid extraction*);

SPE – Extração em fase sólida (do inglês, *solid phase extraction*);

SRM – Monitoramento de reações selecionadas (do inglês, *selected reaction monitoring*);

TCA – Ácido tricloroacético (do inglês, *trichloroacetic acid*);

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria;

UHPLC – Cromatografia líquida de ultra alta eficiência (do inglês, *ultra high performance liquid chromatography*);

UPLC – Cromatografia líquida de ultra performance (do inglês, *ultra performance liquid chromatography*);

WHO – Organização Mundial da Saúde (OMS, do inglês, *World Health Organization*);

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16

2. OBJETIVOS 19

2.1 OBJETIVO GERAL.....19

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 19

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA 20

3.1 AQUICULTURA.....20

3.1.1 Infraestrutura utilizada na aquicultura.....22

3.1.2 Aplicação de medicamentos veterinários na piscicultura 25

3.2 CLASSES DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS UTILIZADOS NA PISCICULTURA 26

3.2.1 Antimicrobianos.....27

3.2.2 Antiparasitários.....37

3.3 MONITORAMENTO DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM ALIMENTOS 39

3.3.1 Planos de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários 40

3.3.2 Monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários no Brasil 41

3.3.3 Monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários na União Europeia 42

3.4 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM SALMÃO 44

3.4.1 Composição das amostras e amostragem 44

3.4.2 Preparo de amostras para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em peixe 45

3.4.3 Determinação de resíduos de medicamentos veterinários por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas 57

3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....63

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....65

4.1 INSTRUMENTAÇÃO, SOLVENTES E MATERIAIS.....65

4.2 PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS.....66

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DOS COMPOSTOS SELECIONADOS.....67

4.4 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM SALMÃO.....67

4.4.1 Ensaios preliminares.....67

4.4.2 Avaliação da fase móvel móvel empregada para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em salmão por UHPLC-MS/MS.....70

4.4.3 Avaliação da coluna cromatográfica e do gradiente de eluição da fase móvel.....72

4.4.4 Otimização das condições da fonte de ionização ESI.....74

4.4.5 Avaliação dos métodos individuais e de método multirresíduo para determinação de medicamentos veterinários em salmão.....75

4.4.6 Método para determinação multirresíduo de medicamentos veterinários por UHPLC-MS/MS em salmão.....80

4.5 PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS MULTIRRESÍDUO.....80

4.5.1 Método QuEChERS (versões original, acetato e citrato).....80

4.5.2 Método QuEChERS modificado para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em salmão.....82

4.5.3 Avaliação da etapa de extração sólido-líquido.....82

4.5.4 Avaliação da presença de aditivos no solvente de extração.....84

4.5.5 Avaliação da composição do solvente de extração.....84

4.5.6 Avaliação da etapa de limpeza e da necessidade de etapa de concentração dos extratos.....85

4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM SALMÃO 85

4.6.1 Seletividade 85

4.6.2 Curva analítica, efeitos de matriz e faixa linear de trabalho 86

4.6.3 Limite de decisão (CCα), capacidade de detecção (CCβ), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) 86

4.6.4 Exatidão, precisão e precisão intermediária 87

4.6.5 Aplicação do método em amostras reais 87

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 89

5.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS MULTIRRESÍDUO 89

5.1.1 Ensaios preliminares 89

5.1.2 Escolha da fase móvel empregada para determinação de resíduos de medicamentos veterinários por UHPLC-MS/MS 90

5.1.3 Escolha da coluna de separação e dos gradientes de eluição da fase móvel 94

5.1.4 Otimização das condições da fonte de ionização ESI 98

5.1.5 Melhores condições do sistema UHPLC-MS/MS para cada analito e avaliação de método multirresíduo 101

5.1.6 Método para determinação multi-classe de resíduos de medicamentos veterinários utilizando UHPLC-MS/MS 101

5.2 PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM SALMÃO 102

5.2.1 Método QuEChERS versões original, acetato e citrato 102

5.2.2 Método QuEChERS adaptado para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em salmão 105

5.2.3 Otimização da etapa de extração sólido-líquido 108

5.2.4 Avaliação da necessidade de aditivos no solvente de extração 109

5.2.5 Avaliação da composição do solvente de extração 111

5.2.6 Avaliação da etapa de limpeza e/ou concentração da amostra .113

5.2.7 Método de extração de resíduos de medicamentos veterinários em salmão 116

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM AMOSTRAS DE SALMÃO 116

5.4 Aplicação do método em amostras reais.....119

6. CONCLUSÕES 121

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 123

REFERÊNCIAS.....124

1. INTRODUÇÃO

Desde o início dos anos 2000 vem ocorrendo um aumento considerável da demanda por produtos oriundos da aquicultura. A China se destaca neste cenário por ser o maior produtor mundial em volume. No mundo o consumo per capita de peixe é de 19,2 kg ano^{-1}. Entretanto, no Brasil consome-se apenas 10,63 kg ano^{-1} per capita. Este fato induz a uma política de intensificação da produção aquícola nacional. Devido à alta rentabilidade da atividade, a exportação de carne de pescado pode vir a ser tão importante para a economia brasileira quanto a carne bovina. Sendo que o Brasil ocupa apenas a 22ª colocação no ranking de exportações de pescado e na 12ª com relação à aquicultura. Se a produção for ampliada pretende-se que o País esteja entre os cinco maiores produtores de peixe em cativeiro do mundo em 2020 (BRASIL, 2015).

Em 2013, o pescado representou cerca de 17% da dieta de proteína animal e 6,7% de proteínas totais consumidas em escala mundial. Além do conteúdo proteico de alta qualidade, sendo fonte de proteínas de fácil digestão e todos os aminoácidos essenciais, o peixe fornece gorduras essenciais, vitaminas e minerais. O consumo de peixe proporciona benefícios à saúde, auxiliando na proteção contra doenças cardiovasculares, no desenvolvimento fetal e infantil do cérebro e do sistema nervoso e, ainda, na correção de dietas desequilibradas (Associação Brasileira da Piscicultura, 2017).

Atualmente, a produção mundial de salmão do atlântico (*Salmo salar*) em viveiro excede 1 milhão de toneladas. Esta espécie constitui mais de 90% do mercado de salmão de viveiro e mais de 50% do mercado global de salmão. O Chile se destaca como país produtor e exportador de salmão, principalmente devido aos baixos custos de mão-de-obra, e vem competindo com países de produção aquícola tradicional (FAO, 2018a).

As principais estruturas utilizadas no cultivo aquícola são tanques-redes e viveiros escavados para a criação de peixes. Os organismos aquáticos, depois de inseridos nas estruturas são cultivados até atingirem o peso comercial para a venda. Durante o processo, realiza-se o monitoramento e organização da produção visando, sobretudo, aumentar a produtividade e prevenir enfermidades. Para isto, são utilizados insumos químicos para o ambiente onde ocorre o cultivo dos animais, como

por exemplo, antibióticos, anestésicos e desinfetantes. Apesar da redução no uso de algumas substâncias, particularmente antimicrobianos, nos últimos 20 anos, esta atividade ainda depende do uso de quimioterápicos para combater infecções bacterianas e infestações de ectoparasitas e a incidência de resíduos destes insumos deve ser monitorada (BURRIDGE et al., 2010; FAO, 2019a).

Os pescados e derivados de cultivo com destino ao Brasil deverão estar acompanhados por certificado sanitário atestando, entre outras, todos os requisitos de qualidade e segurança tendo sido submetido ao Programa Oficial de Controle de Resíduos e Contaminantes em Pescado (MAPA, 2019).

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é um dos principais programas de inspeção e fiscalização da produção de alimentos no Brasil. O objetivo do programa é o monitoramento da efetividade dos controles de risco, qualidade e segurança implementados em diferentes cadeias produtivas, tanto animal como vegetal.

Além das classes dos anfenicóis, nitrofuranos, tetraciclinas, quinolonas e fluoroquinolonas presentes no plano de monitoramento brasileiro, programas de monitoramento internacionais, como o da União Europeia, abrangem também classes como os aminoglicosídeos, benzamidas, macrolídeos, lactonas macrocíclicas, nitroimidazóis, organofosforados, penicilinas e piretróides (BURRIDGE et al., 2010).

As amostras de peixes são consideradas complexas devido a sua composição, apresentando propriedades físico-químicas distintas, e por isso, requerem um método de preparo de amostra adequado, pois é fundamental para monitoramento de resíduos de medicamentos de uso veterinário (GUIDI et al., 2017). Métodos de preparo de amostra são constantemente desenvolvidos em busca de facilitar a execução dos ensaios, diminuir o custo envolvido, aumentar a aplicabilidade com eficiência adequada e garantir a qualidade dos resultados para monitoramento de resíduos de medicamentos abaixo dos limites estabelecidos pela legislação (STOLKER & BRINKMAN, 2005). Entretanto, basicamente os métodos encontrados na literatura para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em tecido de peixe baseiam-se na técnica de extração sólido-líquido. Logo, técnicas de separação, identificação e quantificação desses compostos também devem ser otimizadas visando diminuir os limites de detecção (LOD, do inglês *Limit Of Detection*) e limites de quantificação (LOQ, do inglês *Limit Of Quantification*) de tais métodos.

A técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é a principal ferramenta aplicada na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por permitir que os resultados sejam obtidos de maneira confiável.

A disponibilidade de resultados e de métodos adequados para obtê-los permite que os órgãos de fiscalização possam tomar as decisões cabíveis no caso de ocorrência de inconformidades em relação às normas vigentes. Estas ações resultam em avanços no sentido de disponibilização de alimentos seguros e da preservação da saúde dos consumidores.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de um método simples e efetivo para determinação de resíduos de várias classes de medicamentos veterinários em salmão (*Salmo salar*) utilizando sistema de cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC, do inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) acoplada a espectrometria de massas em série (MS/MS, do inglês *tandem mass spectrometry*)..

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar as condições empregadas ao sistema UHPLC-MS/MS:

a) Avaliar a influência da composição da fase móvel na intensidade de sinal dos compostos em estudo;
b) Avaliar diferentes configurações de gradiente de eluição da fase móvel e diferentes colunas cromatográficas;
c) Avaliar as condições da fonte de ionização em termos de temperatura do gás de dessolvatação, voltagem do capilar e vazão da fase móvel;
d) Avaliar a etapa de preparo de amostra em função do solvente de extração, aplicação de sais de partição, necessidade de aditivos ácidos e complexantes e métodos de limpeza de extrato;
e) Validar o método desenvolvido de acordo com normas internacionais para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos e outros;
f) Aplicar o método proposto para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de salmão;
g) Ainda, obter informações que permitam a disponibilização de métodos analíticos adequados para a quantificação e identificação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de peixes

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 AQUICULTURA

A criação ou cultivo de organismos aquáticos, através da utilização de técnicas destinadas a aumentar a produção para além da capacidade natural do ambiente, é definida como aquicultura (CD/88/EC, 2006). A partir de 2010, foi notável o aumento da demanda por produtos oriundos da aquicultura. As razões para esta maior demanda estão associadas com o aumento demográfico mundial, diminuição do preço das commodities e com o aumento da preocupação dos consumidores com a saúde, uma vez que estes alimentos são conhecidos por serem benéficos do ponto de vista nutricional. Por estas razões, acredita-se que o crescimento deste setor será constante. Entre as espécies de maior produção estão o salmão (*Salmo Salar*), truta (*Oncorhynchus mykiss*), dourado (*Sparus Aurata*), carpa (*Cyprinus Carpio*), mexilhões (*Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis*) e ostras (*Crassostrea gigas* e *Ostrea edulis*).

Desde 2002, a China é o principal produtor de pescado e o maior exportador de peixe e produtos derivados, embora represente apenas 1% do comércio total de mercadorias. A Noruega e o Vietnam seguem com o segundo e terceiro lugar, respectivamente, em exportações. O crescimento constante da indústria aquícola impulsiona outros países ou associação de países, como a União Europeia, a pensarem em estratégias econômicas para desenvolvimento da aquicultura (FAO, 2019b; STECF, 2013). Entretanto, o impacto ambiental causado pela atividade é conhecido e deve ser gerenciado de maneira a garantir que a aquicultura não interfira nas outras atividades que dependem do mesmo recurso natural (EC, 2012).

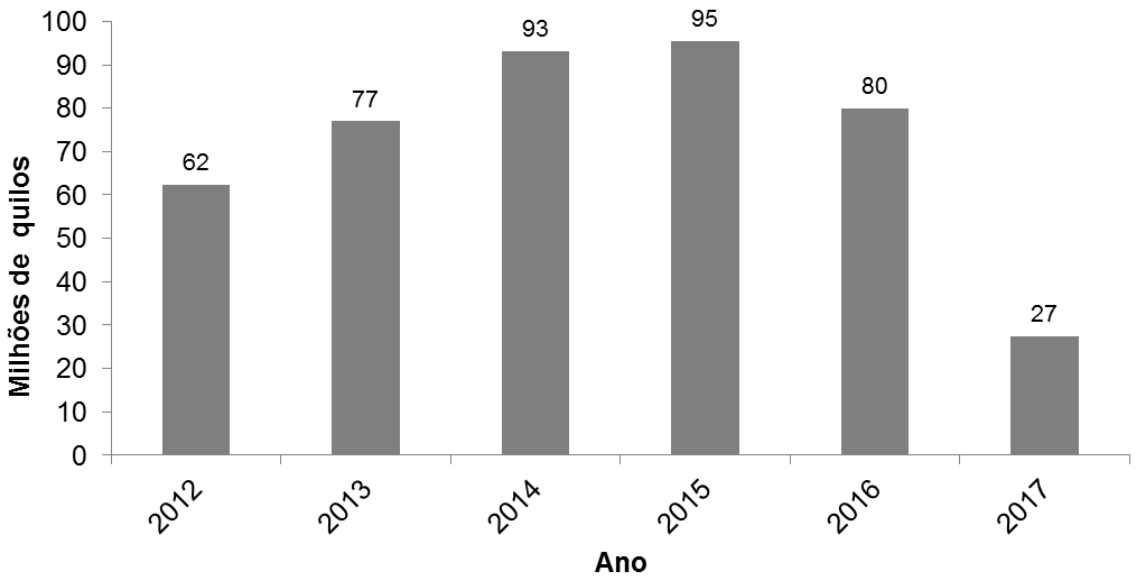
No Brasil, a aquicultura é uma atividade profissional relativamente nova e possui alta capacidade de desenvolvimento em diferentes área. Entre essas áreas, destacam-se a pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias, espécies e processos produtivos. Em 2017 a produção de peixes cultivados atingiu, aproximadamente, 692 mil toneladas, sendo a atividade zootécnica que mais vem crescendo nos últimos 10 anos. A atividade movimenta cerca de R$ 4,7 bilhões ano^{-1}, gera 1 milhão de empregos diretos e indiretos e cresce a taxas superiores a 10% ao ano. Para suprir a produção são necessárias, em média, cerca de 900 mil toneladas

de rações, que movimentam R$ 1,2 bilhão ano^{-1}. Em cinco anos, o objetivo é atingir 1 milhão de toneladas produzidas e movimentar cerca de R$ 7 bilhões. A produção de proteína animal que mais cresce no mundo é a proveniente da aquicultura e o Brasil tem terras, águas e competência para se destacar no mercado global de peixes cultivados, assim como destaca-se na pecuária, avicultura e suinocultura. A aquicultura continuou a crescer em 2017, com o aumento da produção de peixes, principalmente pelo avanço da produção de tilápia e de camarões em cativeiro. A tilápia segue como a principal espécie cultivada no Brasil, representando 51,7% da produção em 2017. Neste período, a produção de ostras, vieiras e mexilhões apresentou pequena queda, impulsionada principalmente pela redução da demanda e pela maior fiscalização, que reduziu a quantidade de produtores, devido a irregularidades (Associação Brasileira da Piscicultura, 2017; IBGE, 2017).

No Rio Grande do Sul, em 2011, o Governo do Estado estabeleceu o Programa de Pesca e Aquicultura. A decisão tem como objetivo formular, coordenar e executar políticas dirigidas a públicos específicos com a estruturação de um departamento de Pesca, Aquicultura, Quilombolas e Indígenas. Em resumo, esta política busca impulsionar a aquicultura familiar e a pesca artesanal, dentro de uma abordagem mais ampla sobre desenvolvimento rural, além de estruturação sob as demandas do setor e articulação com outras políticas que atendam o mesmo público. Esta política tem como um de seus pilares a capacitação dos produtores para garantir produtos de alta qualidade. Entretanto, desde 2015, não houve um crescimento expressivo da atividade no estado (IBGE, 2017).

Ao longo das últimas décadas o Brasil vem ampliando sua atuação no mercado internacional como país importador de alguns tipos de produtos de origem animal, especialmente pescados. A Figura 1 apresenta o perfil de importações de salmão entre janeiro de 2012 e abril de 2017. Neste período, as importações foram superiores a 435 milhões de quilos. Destacam-se os anos de 2014 e 2015 com importações superiores a 93 milhões de quilos. Chile, Estados Unidos e Noruega foram os principais países fornecedores (SISCOMEX, 2017).

Figura 1 – Perfil de importações de salmão no Brasil entre janeiro de 2012 e abril de 2017



Fonte: Siscomex, 2017.

3.1.1 Infraestrutura utilizada na aquicultura

A aquicultura pode ser realizada em qualquer tipo de água (doce, pouco salinizada ou marinha). A água utilizada para criação de animais requer um controle na qualidade de diferentes parâmetros como oxigênio dissolvido, temperatura, compostos nitrogenados (amônia, nitrito, nitrato), metais, entre outros. Estes parâmetros podem variar de acordo com o animal cultivado (peixes, camarões, moluscos, algas, rãs, jacarés, etc.), tipo de ração, exposição a luz solar, tipos de solo entre outros. A atividade aquícola pode ser dividida nas seguintes áreas:

• Piscicultura (criação de peixes, em água doce ou marinha);

• Malacocultura, sendo subdividida em ostreicultura, mitilicultura e pectinicultura referentes a criação de ostras, mexilhões e vieiras, respectivamente;

• Carcinicultura (criação de camarão);

• Algicultura (cultivo de macro ou microalgas);

• Ranicultura (criação de rãs);

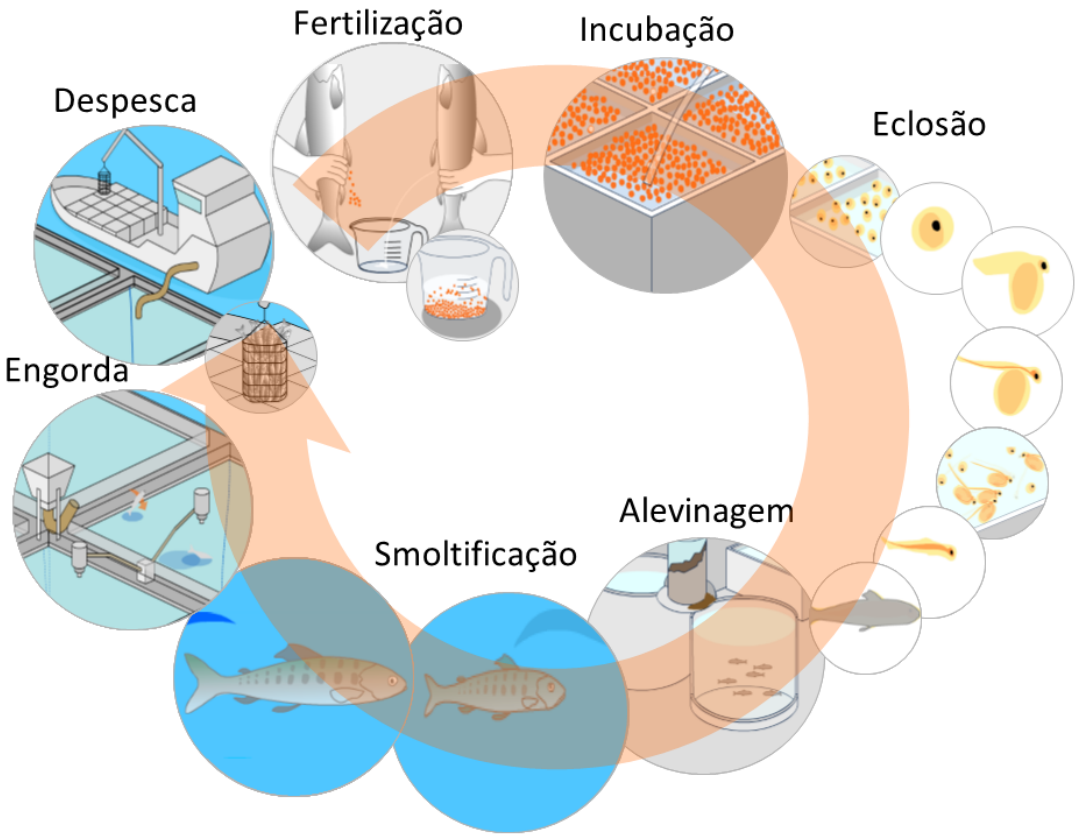
• Criação de jacarés

A criação de peixes pode ser realizada em viveiros ou, ainda, tanques-rede e gaiolas flutuantes. Estas estruturas são construídas com diferentes tipos de materiais como, por exemplo, plástico. Estes materiais são preferencialmente utilizados devido à algumas características como densidade (menor que 1 g mL^{-1}), permitindo a sua

flutuação, e circulação adequada de água. Os tanque-rede são fixados no solo através de cordas, poitas, cabos de aço ou âncoras (DE FARIA et al., 2014).

A fertilização é realizada no outono, quando ocorre a desova dos reprodutores. Os óvulos das fêmeas e o sêmen dos machos são colhidos. O processo é realizado a em temperaturas entre 6 e 8 °C. Os ovos são secos, fertilizados, depois endurecidos e desinfetados antes de serem colocados em bandejas ou sistemas de silo. Este é um estágio delicado, onde a manutenção é realizada para garantir águas claras e bem oxigenadas, com temperatura máxima de 12 ºC, e condições escuras. Nesse período, o manuseio dos ovos deve ser mínimo, reduzindo-se apenas à extração dos ovos não-fecundados, que são facilmente distinguidos pela cor opaca esbranquiçada. Após quatro semanas em uma incubadora, os ovos atingem o estado conhecido como " óvulo-olho", sendo fortes o suficiente para tolerar o transporte. Os alevinos são transferidos para tanques usando sistemas de recirculação ou vários sistemas de recirculação. Quando eclodem, os filhotes continuam ligados à suas vesículas vitelinas por aproximadamente um mês até a absorção da vesícula vitelina. Depois desta fase os filhotes começam a se alimentar até se tornar o chamado “parr” juvenil, ou salmão juvenil, com o corpo alongado, nadadeiras e listras esverdeadas ao longo do corpo. Neste estágio os peixes crescem mais rapidamente, devido ao aumento de suas necessidades nutricionais. Quando os peixes são grandes o suficiente começam o processo de aumento de tolerância a água do mar. Quando são capazes de tolerar á agua do mar, os peixes passam da fase “parr” para a fase "smolt". A etapa de smoltificação pode ser realizada à temperatura ambiente e a regimes de luz, resultando em “smolts” na primavera do ano seguinte à eclosão, ou em regimes de luz e temperatura controlados para induzir a smoltificação precoce. Durante a smoltificação o salmão perde suas marcas "parr" (listras coloridas ao longo do corpo), o estômago fica prateado e as costas ficam verdes ou marrons. Neste estágio os peixes começam a ser alimentados com dietas especiais de engorda até o momento de despesca (FAO, 2019a; SALMONCHILE, 2019). O ciclo de produção do salmão pode ser visualizado na Figura 2.

Figura 2 – Ciclo de produção de salmão em cativeiro



Adaptado de (SALMONCHILE, 2019)

Na produção de peixes, normalmente os animais estão suscetíveis à doenças devido ao confinamento. As enfermidades, podem originar-se devido às condições físico-químicas e biológicas da água, do clima e do manejo. Para evitar a proliferação de doenças, cuidados com os níveis de oxigênio dissolvido, pH, concentração de amônia e nitrito, matéria orgânica em suspensão e temperatura devem ser monitoradas. Condições biológicas como, dominância hierárquica, agressão, territorialidade, presença de predadores e alimentação também podem agravar a proliferação de doenças e devem ser igualmente monitoradas, assim como estresse por altas densidades de estocagem, confinamento, transporte e despesca. Outrossim, a presença de patógenos como parasitas, bactérias, fungos e vírus levará à proliferação de doenças, sendo necessário o uso de medicamentos de maneira profilática e terapêutica, a fim de evitar perdas durante o cultivo. Entretanto, o uso inadequado de medicamentos veterinários pode levar a danos ao ambiente, ao animal cultivado e ao consumidor (LIMA et al., 2015).

3.1.2 Aplicação de medicamentos veterinários na piscicultura

Os sistemas modernos de reprodução intensiva devem ser concebidos e geridos de modo a garantir que a exposição a medicamentos veterinários em animais destinados à produção de alimentos não represente um risco para a saúde humana ou para o ambiente (CHILE, 2015). A aplicação de medicamentos veterinários na piscicultura, tanto continental quanto marinha, pode ser realizada através da adição direta na água, na ração, por gavagem ou injeções (TREVES-BROWN, 2000).

O método mais simples e comum é a utilização de medicamentos na água em que os peixes estão confinados. A distribuição e a concentração de medicamento na água é essencial e é facilmente alcançada através de cálculos de diluição. Os medicamentos mais indicados para este tipo de aplicação são aqueles que apresentam baixa massa molecular e considerável solubilidade em água. A presença de medicamentos na água promove o tratamento dos peixes e a prevenção da transmição de doenças pelo tratamento de patógenos livres na água. As vantagens da aplicação em água são a simplicidade e a capacidade de medicação de um grande número de animais. No caso de animais herbívoros, a aplicação de medicamentos é realizada em água uma vez que estes animais não são alimentados com ração. Entre as desvantagens destacam-se o desperdício de medicamento, uma vez que apenas 5% será absorvido pelo animal. Assim, haverá um aumento com os custos de produção (aquisição de medicamentos e limitação a tratamento com medicamentos mais baratos). Além disso, a quantidade de medicamento não absorvida é liberada para o meio ambiente em sua forma original ou ainda como produto de degradação causando distúrbios no ecossistema. Os métodos de aplicação mais utilizados são a imersão ou mergulho, infiltração hiperosmótica, aplicação direta pré-enxague (realizada de maneira diferente na piscicultura continental e na marinha) e submersão de recipientes (para culturas de lagoa). Estes métodos são principalmente aplicados visando a manutenção da água e dos meios de transmissão de doenças. Portanto, normalmente são aplicados medicamentos de modo profilático (KUMAR; ROY, 2017; TREVES-BROWN, 2000).

A aplicação de medicamentos através da ração tem uma grande vantagem econômica. Este meio gera menos desperdício quando comparado à aplicação direta na água. Entretanto, o uso de ração tem alguns problemas envolvidos. O primeiro deles é que a ração para peixes só pode ser utilizada para criação de peixes adultos,

normalmente alevinos em estágios iniciais não podem ser tratados com este tipo de aplicação. Outro caso é quando algumas espécies de peixes, como o salmão do pacífico, entra em estágio de reprodução e para de se alimentar impossibilitando o tratamento através da ração. Outra desvantagem ocorre devido a diminuição ou cessão da alimentação pela maioria das espécies, quando enfermas. Por isso, esta forma de aplicação é majoritariamente utilizada para fins profiláticos. Normalmente, as concentrações de medicamentos em rações estão na faixa de g ton^{-1} (KUMAR; ROY, 2017; TREVES-BROWN, 2000).

A composição das rações utilizadas para nutrição de peixes é composta de proteína vegetal, óleo vegetal e animal, entre outros e, geralmente, comercializada na forma de pastilhas (*pellets*). Para que a distribuição de medicamento seja uniforme em um lote de ração por exemplo, é necessário que o medicamento seja adicionado e misturado antes da formação das pastilhas. Esta maneira torna-se inviável para o pequeno produtor de peixes, uma vez que não possui maquinário necessário para produção das pastilhas. Por outro lado, os produtores de ração teriam um gasto excessivo para limpeza do sistema após a fabricação de ração aditivada de medicamentos. Além disso, o processo de formação das pastilhas envolve altas temperaturas, o que limita o uso desta técnica a medicamentos que são termicamente instáveis. Consequentemente, mesmo sendo a técnica mais apropriada, devido a alta homogeneidade e baixa taxa de lixiviação, não é a mais utilizada (KUMAR; ROY, 2017; TREVES-BROWN, 2000).

Uma alternativa é o revestimento das pastilhas de ração por medicamentos. Para aumentar a eficiência e diminuir a lixiviação são utilizados alguns agentes ligantes, como óleos de origem vegetal e animais. Técnicas de microencapsulamento de medicamentos estão em constante desenvolvimento para resolução de problemas como lixiviação, homogeneidade e baixa absorção dos medicamentos pelos peixes (FAO, 2019a; TREVES-BROWN, 2000).

3.2 CLASSES DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS UTILIZADOS NA PISCICULTURA

O Codex Alimentarius (2012), define os medicamentos veterinários como todas as substâncias que são aplicadas para fins terapêuticos, profiláticos, de diagnóstico, de modificação de funções fisiológicas ou comportamento em animais que tenham

produtos destinados a alimentação humana, como por exemplo, bovinos, aves, pescados, suínos, abelhas, entre outros. Entre as diversas classes de medicamentos veterinários existentes, pode-se citar os antimicrobianos.

3.2.1 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são agentes antibacterianos derivados de organismos vivos ou sintéticos. O uso destes compostos em aplicações veterinárias começou na década de 1950, com a utilização da oxitetraciclina e da clortetraciclina como aditivos de rações destinadas a alimentação animal. Atualmente, diversas classes de antimicrobianos são utilizadas no tratamento de doenças, manutenção da profilaxia ou como promotores de crescimento. Nos últimos anos, o termo antimicrobiano tem sido aplicado de modo mais restrito para indicar substâncias que agem nas bactérias. Estes compostos são denominados bactericidas quando tem efeito letal sobre as bactérias e bacteriostáticos, quando interrompem a reprodução ou inibem o metabolismo de bactérias. Estes compostos são divididos em diversas classes como por exemplo: tetraciclinas, aminoglicosídeos, anfenicóis, macrolídeos, entre outros (CHILE, 2015; GUIMARÃES et al., 2010).

3.2.1.1 Anfenicóis

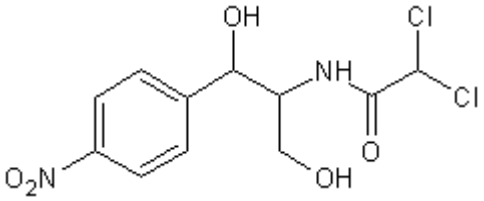
Os anfenicóis são uma classe de antimicrobianos especialmente eficazes contra microorganismos anaeróbios. Eles agem ligando-se a subunidades ribossômicas de bactérias susceptíveis, inibindo a peptidil transferase e impedindo a transferência de aminoácidos para cadeias peptídicas em crescimento e subsequente formação de proteínas (GUIDI et al., 2017; TREVES-BROWN, 2000).

O cloranfenicol foi o primeiro anfenicol disponível sendo originalmente isolado de *Streptomyces venezuelae*, uma bactéria do solo. O uso veterinário deste princípio ativo inclui o tratamento de infecções entéricas e pulmonares, abscessos de pele e órgãos e mastite. O uso indiscriminado de cloranfenicol pode causar alguns efeitos colaterais como, por exemplo, reações alérgicas, perturbação da flora microbiana intestinal, efeitos hemotóxicos e depressão da medula óssea. Ainda, a aplicação de cloranfenicol em salmão leva ao retardo de crescimento dos peixes (GUIDI et al., 2017; TREVES-BROWN, 2000).

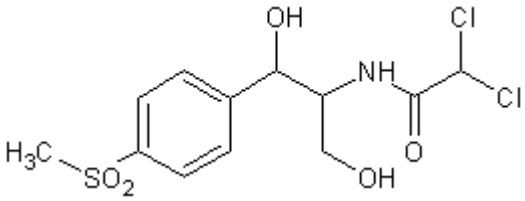
O cloranfenicol é um antibiótico raramente utilizado de forma sistematicaem medicina veterinária por dois motivos. O primeiro é que mesmo baixas concentrações deste composto podem causar anemia aplástica, o que levou a proibição do uso deste medicamento em alimentos destinados ao consumo humano. A segunda razão é que o uso de cloranfenicol no tratamento de outras doenças pode levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana. Sendo que este é um dos únicos antibióticos efetivos no tratamento da febre tifoide, causada pela *Salmonella typhi*, a maior preocupação é que a resistência ao cloranfenicol possa ser transmitida à esta bactéria (GUIDI et al., 2017). O metabolismo em peixes ocorre de maneira diferente da observada em mamíferos (GUIDI et al., 2017; TREVES-BROWN, 2000).

Quando o tratamento com anfenicóis é necessário, tianfenicol e o florfenicol são compostos alternativos que são utilizados na piscicultura. Estes diferem-se do cloranfenicol pela presença do grupo metilsulfona no lugar do grupamento nitro, de acordo com a Figura 3. A presença deste grupo evita o desenvolvimento da anemia aplástica. Na maioria dos casos, o tianfenicol não é metabolizado em bovinos, aves, ovelhas ou seres humanos, e é excretado inalterado. Em suínos e ratos pode ser excretado como glucanato de tianfenicol. O florefenicol apresenta um átomo de flúor em sua estrutura (Figura 3), ao contrário da hidroxila presente no tianfenicol. Normalmente, as bactérias resistentes a tianfenicol e cloranfenicol tem a capacidade de acetilação da hidroxila. Uma vez que o florfenicol não apresenta este grupo, ele é uma alternativa para bacterias resistentes a tianfenicol e cloranfenicol. Este princípio ativo é altamente utilizado na aquicultura. O resíduo marcador do florfenicol é o florefenicol-amina que sofre uma hidrólise do grupo dicloroacetamida (GUIDI et al., 2017; TREVES-BROWN, 2000).

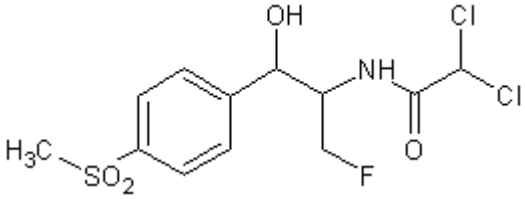
Figura 3 – Estruturas químicas dos compostos cloranfenicol (A), tianfenicol (B) e florfenicol (C)



A - Cloranfenicol



B - -Tianfenicol



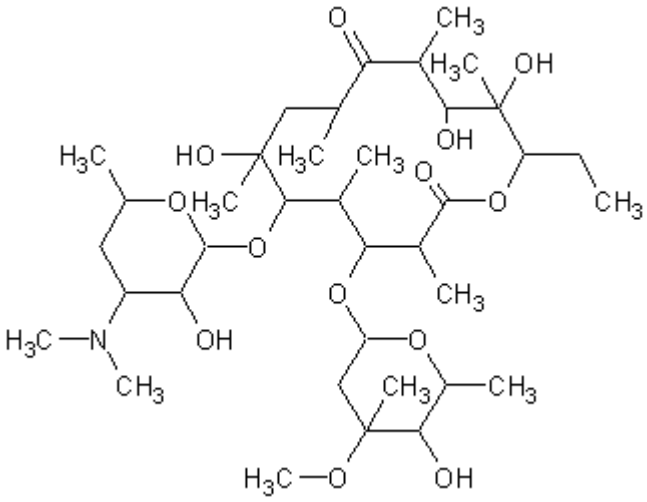
C – Florfenicol

Adaptado de (GUIDI et al., 2017)

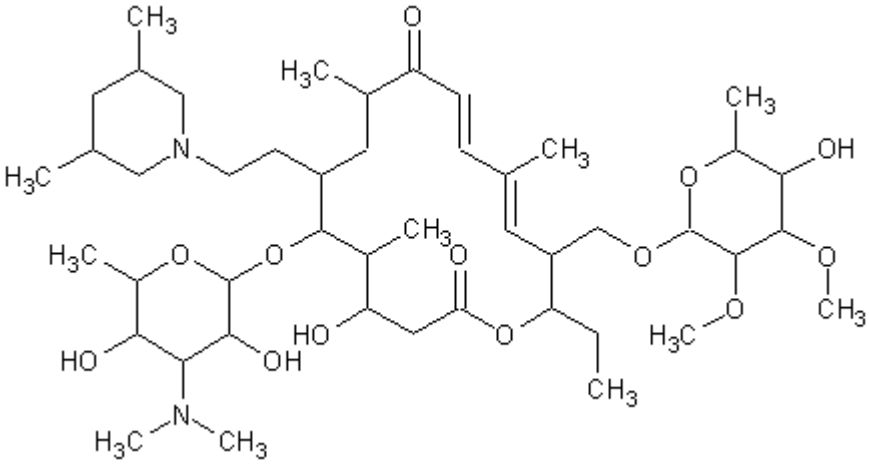
3.2.1.2 Macrolídeos

Os macrolídeos são uma classe de compostos que contem em sua estrutura anéis característicos de 12, 14 e 16 membros com sacarídeos ligados por ligações glicosídicas. Entretanto, nenhum dos compostos com anéis de 12 membros é utilizado como medicamento. Entre os mais conhecidos estão eritromicina, tilmicosina e tilosina. As estruturas destes compostos estão demonstradas na Figura 4. Os macrolídeos são antimicrobianos de médio espectro, frequentemente ativos contra bactérias Gram-positivas como Chlamydia e Rickettsia. Uma vez que a maioria dos patógenos bacterianos nocivos aos peixes são gram-negativos, o uso de macrolídeos fica restrito a doenças de rim, estreptocicose, Chlamydia e Piscirickettsia. Um dos problemas da utilização de macrolídeos é a baixa palatabilidade quando adicionado a ração. Sendo assim, o tratamento ou profilaxia utilizando esta classe de compostos pode ser realizado em água ou por meio de injeções. Para garantir máxima eficiência, quando medicamentos desta classe tem de ser adicionados à ração normalmente se realizam estudos para verificar as condições ótimas de concentração, aditivos, dias de tratamento e temperatura da água. Entre as principais características químicas dos macrolídeos está a formação de cristais pouco solúveis, o comportamento básico e a solubilidade em ácidos e bases. Contudo, são estáveis em faixas estreitas de pH, no caso da eritromicina entre 6 e 8 (MCGLINCHEY et al., 2008; TREVES-BROWN, 2000).

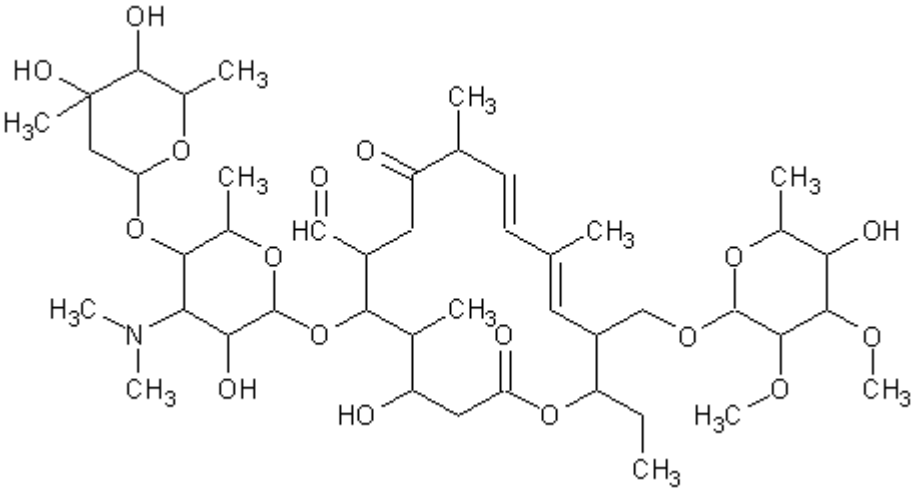
Figura 4 – Estrutura química dos compostos eritromicina (A), tilmicosina (B) e tilosina (C).



A - Eritromicina



B - Tilmicosina

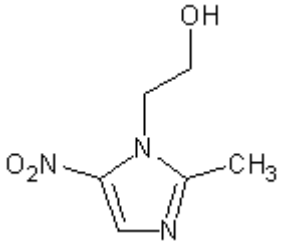


C - Tilosina
Adaptado de (PUBCHEM, 2017)

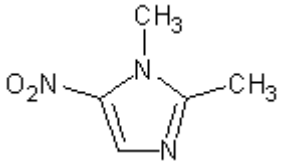
3.2.1.3 Nitroimidazóis

Os nitroimidazóis são um grupo estabelecido de agentes antiprotozoários e antibacterianos. No entanto, eles têm atividade limitada contra bactérias aeróbicas. Estes compostos são heterociclos de imidazol com um grupo NO_2 incorporado a estrutura na quinta posição do anel. Exemplos destes compostos são o metronidazole, dimetridazole e ronidazole, cujas estruturas estão demonstradas na Figura 5. Os potenciais de dissociação ácida dos nitroimidazóis variam entre 1 e 3.

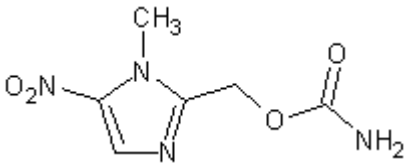
Figura 5 – Estrutura química dos compostos metronidazole (A), dimetridazole (B) e ronidazole (C)



A – Metronidazole



B – Dimetridazole



C – Ronidazol

Adaptado de (MAHUGO-SANTANA et al., 2010)

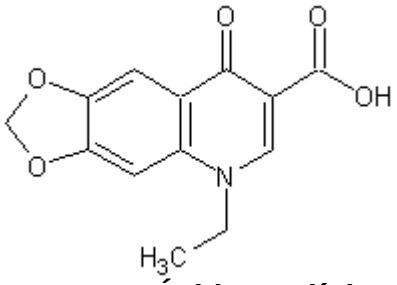
Os nitroimidazóis são rapidamente metabolizados formando hidróxidos. O composto ronidazol tem uma via metabólica diferente e mostra apenas um metabolito menor contendo o anel imidazol, o mesmo metabólito encontrado para dimetridazol (2-hidroximetil-1-metil-5-nitro-imidazol). Os nitroimidazóis possuem propriedades genotóxicas, carcinogênicas e mutagênicas em algumas espécies animais, assim como seus metabolitos. Por isso, atualmente, poucos compostos são utilizados. Na União Europeia, a utilização de dimetridazol, metronidazol e ronidazol é proibida na

produção de animais destinados ao consumo humano. Os nitroimidazóis podem ser aplicados em medicina humana e veterinária para tratar doenças causadas por protozoários (por exemplo, *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolicia*) e infecções bacterianas (coccidiose e enterite hemorrágica). Na produção de alimentos, efeitos desejáveis como promoção do crescimento e melhoria da eficiência alimentar também são destacados (MAHUGO-SANTANA et al., 2010; TREVES-BROWN, 2000).

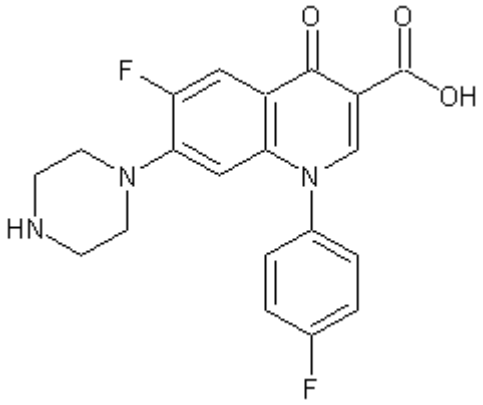
3.2.1.4 Quinolonas e Fluoroquinolonas

As quinolonas incluem os compostos de amplo espectro ácido oxolínico, sarafloxacina, danofloxacina, difloxacina e enrofloxacina demonstrados na Figura 6. Dentre estes, o ácido oxolínico é de grande interesse para aquicultura pois foi desenvolvido especialmente para uso em peixes. As fluoroquinolonas são um sub-grupo descoberto pela adição de um átomo de fluor na estrutura das quinolonas, ocasionando um aumento da atividade antibacteriana. Na aquicultura, as quinolonas são administradas por imersão devido a sua solubilidade, sendo absorvidas nos peixes através da guelrras. Elas inibem a topoisomerase II, uma DNA-girase, impedindo o enrolamento das fitas de DNA para formar a dupla-hélice da bactéria. Com a inibição da duplicação e da transcrição do DNA não há síntese proteica (GUIMARÃES et al., 2010). Estes compostos possuem como característica a presença de um grupamento ácido carboxílico que confere comportamento ácido com pKa em torno de 6,5. Ainda podem formar complexos com cátion bi-valentes, como o Mg^{2+}, diminuindo sua atividade. (HERNÁNDEZ-ARTESEROS et al., 2002; TREVES-BROWN, 2000; VSDB, 2019).

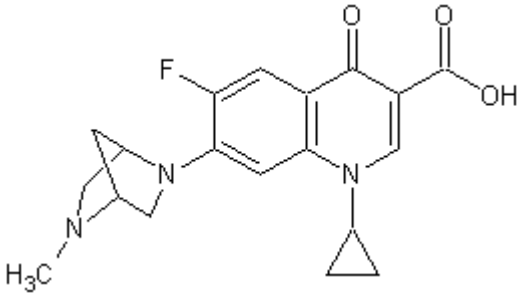
Figura 6 – Estruturas químicas dos compostos ácido oxolínico (A), sarafloxacina (B), danofloxacina (C), difloxacina (D) e enrofloxacina (E)



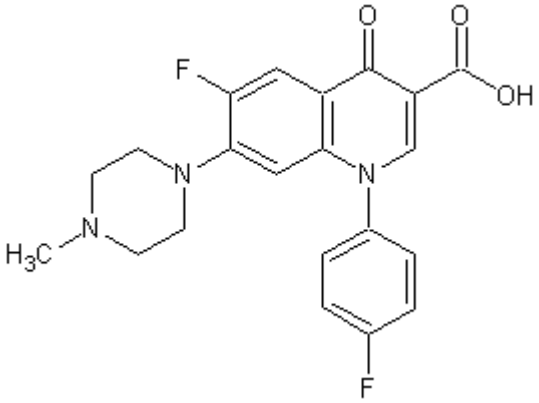
A - Ácido oxolínico



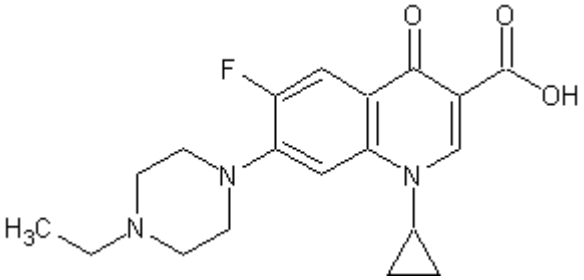
B – Sarafloxacina



C – Danofloxacina



D – Difloxacina



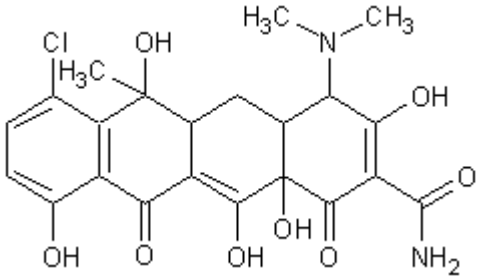
E – Enrofloxacina

Adaptado de (HERNÁNDEZ-ARTESEROS et al., 2002)

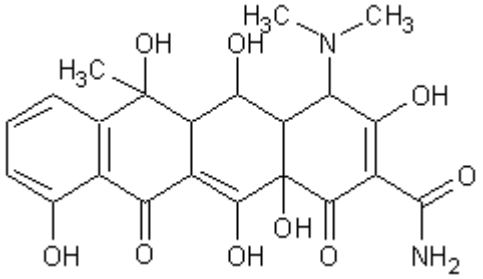
3.2.1.5 Tetraciclinas

As tetraciclinas são antibióticos com ampla faixa de ação microbiológica. Estes compostos são derivados de *streptomyces ssp*. São compostos amplamente utilizados na aquicultura, especialmente a oxitetraciclina devido ao baixo custo de aquisição deste medicamento. Consequentemente, o uso abusivo destes compostos facilitou o desenvolvimento de resistência por parte das bactérias. Os casos de *furunculosis* por exemplo já não podem ser tratados utilizando tetraciclinas. As tetraciclinas agem pela inibição da síntese proteica das bactérias. Normalmente, estes compostos são utilizados no tratamento e prevenção de doenças, embora, também sejam utilizados como promotores de crescimento devido ao seu baixo custo. Os compostos, pertencentes ao grupo das tetraciclinas, tem estruturas semelhantes entre si e estão exemplificadas na Figura 7, onde podem ser observados as estruturas dos compostos clortetraciclina, oxitetraciclina e tetraciclina. As tetraciclinas apresentam baixos valores de K_{ow} e têm como característica principal a capacidade de formar complexos com os cátions bivalentes, além de apresentarem valores de pKa < 7 (ÖNAL, 2011).

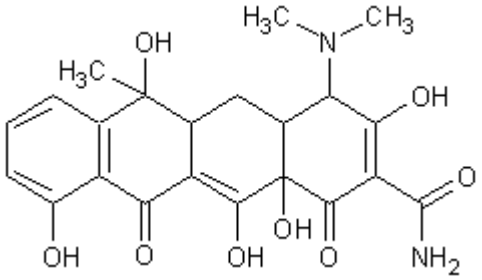
Figura 7 – Estruturas químicas dos compostos clortetraciclina (A), oxitetraciclina (B) e tetraciclina (C)



A – Clortetraciclina



B – Oxitetraciclina



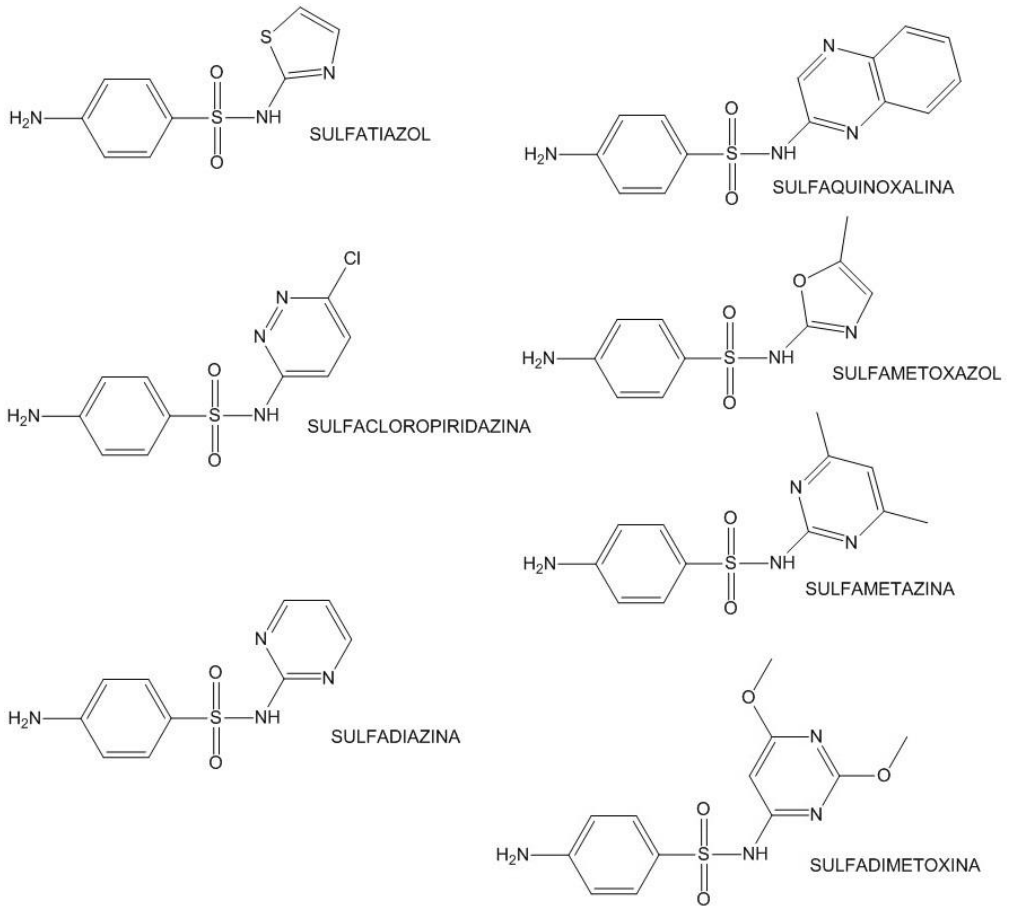
C – Tetraciclina

Adaptado de (ÖNAL, 2011)

3.2.1.5 Sulfonamidas

As sulfonamidas são análogos estruturais do ácido p-aminobenzóico e apresentam ação bacteriostática de amplo espectro. Algumas bactérias exigem a presença de ácido p-aminobenzóico para a síntese de ácido fólico, as sulfonamidas podem substituir o ácido p-aminobenzóico, formando análogos não funcionais do ácido fólico. Como conseqüência, não ocorre crescimento das bactérias, portanto, atuam como bacteriostáticos. Dentre os exemplos de sulfonamidas destacam-se sulfacloropiridazina, sulfadiazina, sulfadoxina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfaquinoxalina, entre outras. Em função do baixo custo e da relativa eficácia em algumas doenças bacterianas, estes compostos são amplamente utilizados (GUIMARÃES et al., 2010). Estas substâncias são poucos solúveis em água, possuem pKa_1 ente 2 e 2,5 e pKa_2 entre 5 e 8, encontram-se na forma neutra em pH entre 3 e 5. As sulfonamidas mais comuns estão representadas na Figura 8 (DMITRIENKO et al., 2014).

Figura 8 – Estruturas químicas das principais sulfonamidas.

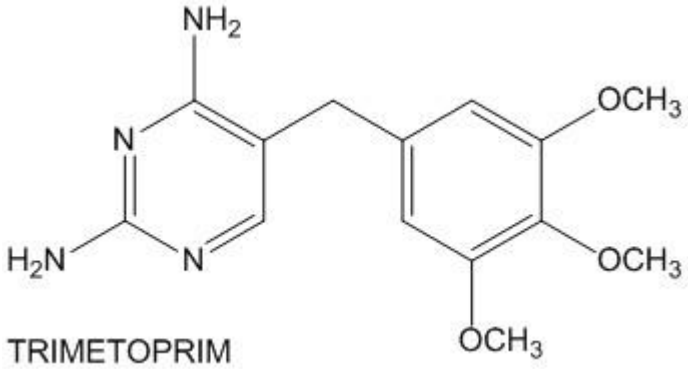


(Adaptado de DMITRIENKO et al., 2014)

3.2.1.6 Trimetoprim

O trimetoprim pertence à classe química das diaminopirimidinas e é um análogo estrutural do ácido diidrofólico. O trimetoprim atua inibindo a enzima diidrofolato redutase, responsável pela transformação do ácido diidrofólico em ácido tetraidrofólico. Geralmente, este composto é utilizado em conjunto com sulfametoxazol (LÉO et al., 2009). O uso mútuo dos dois compostos resulta no aumento da atividade antibacteriana, geralmente em casos de infecções do sistema urinário (ADEGOKE et al., 2014). O trimetroprim, apresenta razoável solubilidade em água, em torno de 0,4 g L^{-1}, $K_{o/w}$ de 8,13 e pKa acima de 7 (VSDB, 2019). A estrutura química deste composto está representada na Figura 9.

Figura 9 – Estrutura química do trimetoprim



(Adaptado de VSDB, 2019)

3.2.2 Antiparasitários

Estes compostos são utilizados para o tratamento de infestações por ectoparasitas e estão divididos em dois grandes grupos: anti-helmínticos e antiprotozoários. Neste trabalho será dado enfoque somente aos anti-helmínticos em função do grande uso destes compostos na medicina veterinária (VENTURINI et al., 2014).

Estes compostos são empregados na profilaxia e no tratamento terapêutico de parasitas em animais. O controle de parasitas como nematóides, lombrigas e tênia em animais destinados a alimentação humana é essencial para a manutenção da saúde animal e da segurança do alimento. Diversas classes de anti-helmínticos têm sido utilizadas na produção animal como por exemplo; benzamidas e piretróides (COOPER et al., 2012).

3.2.2.1 Piretróides

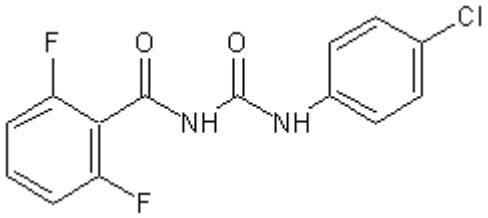
Os piretróides são ésteres classificados comoinseticidas sintéticos. A síntese é realizada através das piretrinas, compostos naturais. Esta classe é amplamente utilizada para fins agrícolas e domésticos. Seu uso aumentou nos últimos anos devido a ação seletiva e degradação geralmente rápida no ambiente. Com exceção da deltametrina, os piretróides são uma mistura complexa de isómeros em vez de um único composto puro. As toxicidades destes compostos podem diferir, em parte,

devido a razões enantioméricas dos produtos. As atividades individuais também diferem com base na sua isomeria óptica. Os piretróides são altamente tóxicos para os invertebrados aquáticos. A sua aplicação na aquicultura está relacionada a alta eficiência, a facilidade de aplicação (realizada diretamente na água) e ao baixo risco ambiental (devido à características dos compostos, e a baixa concentração). A deltametrina é um do exemplos desta classe que é amplamente utilizada no combate a pulgas d'água (ALBASEER et al., 2011; TREVES-BROWN, 2000).

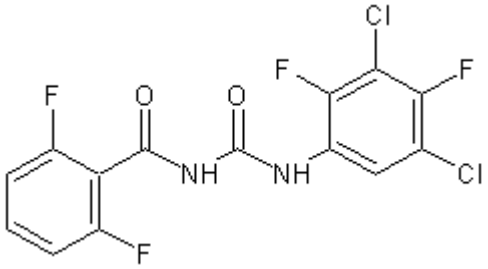
3.2.2.2 Benzamidas

Os compostos da classe das benzamidas ou benzil-uréias funcionam como inibidores da síntese de quitina. A quitina é o polissacarídeo que compõe o exoesqueleto de artrópodes. Logo, as benzamidas pertencem a classe de inseticidas conhecidos como reguladores do crescimento de insetos. Por consequência, os inibidores da síntese de quitina são eficazes contra os estágios larvais e pré-adultos de piolhos do mar e menos eficazes contra os piolhos adultos. Assim, os tratamentos são mais eficazes antes da fase adulta dos parasitas. Nestes casos, um tratamento prévio de banho com organofosforados, como por exemplo o triclorfom, auxilia na remoção de piolhos adultos para posterior aplicação das benzamidas. Quando usados corretamente, o tratamento com teflubenzuron e diflubenzuron pode romper o ciclo de vida dos piolhos do mar adiando novos tratamentos e aplicações. Estes compostos, têm como características químicas os coeficientes de partição octanol-água moderados e a solubilidade em água relativamente baixa, suas estruturas químicas podem ser observadas na Figura 10. Sendo assim, tendem a permanecer ligados a matéria orgânica dos sedimentos e do ambiente e não são persistentes em água doce (BURRIDGE et al., 2010; TREVES-BROWN, 2000).

Figura 10 – Estrutura química dos compostos dilfubenzuron (A) e teflubenzuron (B)



A – Diflubenzuron



B - Teflubenzuron

Adaptado de (TREVES-BROWN, 2000)

3.3 MONITORAMENTO DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM ALIMENTOS

A norma NBR ISO 22000 aborda o sistema de gestão da segurança dos alimentos e define que estes não devem constituir vias de exposição a perigos que possam causar danos à saúde, sejam eles agentes biológicos, físicos ou químicos (NBR ISO 22000, 2006). Entre os perigos químicos, destacam-se os resíduos e contaminantes. A segurança dos alimentos destinados ao consumo humano é diretamente afetada pela presença de resíduos de medicamentos veterinários, principalmente aqueles cuja produção é sabidamente dependente do uso de tais insumos, como é a aquicultura. Além de atingir os animais confinados durante o processo de produção, os medicamentos veterinários utilizados ao longo da cadeia produtiva podem atingir animais próximos às instalações aquícolas. Estes animais representam, portanto, riscos à saúde humana visto que estão livres para serem capturados e consumidos (BURRIDGE et al., 2010; CABELLO, 2006; FORTT et al., 2007).

Além disso, a aplicação de antimicrobianos em grande quantidades pode afetar a saúde dos trabalhadores aquícolas uma vez que inalação, ingestão ou contato de material particulado ou pulverizado com a pele pode alterar a flora humana, selecionar bactérias resistentes aos antibióticos e potencialmente gerar problemas de alergia e toxicidade (BURRIDGE et al., 2010; CABELLO, 2006; FORTT et al., 2007).

Neste mesmo contexto, existe ainda a preocupação com a contaminação ambiental por parte do uso de antimicrobianos, pois muitos deles são quimicamente estáveis e se mantém ativos mesmo depois de administrados e excretados no meio ambiente. Os resíduos de medicamentos veterinários aumentam a possibilidade de seleção natural de bactérias resistentes a antibióticos que podem afetar animais e seres humanos. Em geral, quanto mais um antimicrobiano é usado, maior o risco de emergência e disseminação de resistência contra ele, devido ao aumento da pressão seletiva, tornando a droga cada vez mais inútil. A maior preocupação é o desenvolvimento de patógenos que tenham resistência a todos medicamentos conhecidos, desencadeando epidemias de doenças bacterianas que não podem ser tratadas (BAQUERO et al., 2008; MARTINEZ, 2009; SILBERGELD et al., 2008).

Portanto, regulamentações para o uso de medicamentos veterinários na produção de alimentos de origem animal são estabelecidas por diferentes países. Os regulamentos visam restringir o uso de tais substâncias sem que isto reflita em custos elevados de produção, demonstrando compatibilidade com a segurança dos alimentos e os lucros do setor (BURRIDGE et al., 2010). Diferentes países e blocos econômicos como a União Europeia, possuem programas de monitoramento dessas substâncias na cadeia alimentar.

3.3.1 Planos de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários

As deficiências nas boas práticas agropecuárias durante a utilização de medicamentos de uso veterinário incorrem no aparecimento de resíduos que podem representar risco à saúde humana. Estes riscos estão estritamente correlacionados com o desrespeito às instruções de uso, tais como: espécie alvo, dosagem, via de administração e período de despesca (DENOBILE & NASCIMENTO, 2004).

O Codex Alimentarius, através do Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods (CCRVDF) define o termo "resíduo" de medicamento veterinário como a fração de uma substância, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento proveniente de produtos agrícolas e/ou animais tratados com estas substâncias. A ocorrência dos resíduos de medicamentos veterinários em tecidos animais pode variar de acordo com o tipo de amostra (musculo, fígado, rim, entre outros) escolhida para ser analisada. Esta variabilidade deve-se as diferentes rotas de metabolismo e as interações que ocorrem com o

princípio ativo após a administração do medicamento no animal (KINSELLA et al., 2009). Assim, de acordo com o metabolismo e/ou interações do princípio ativo os resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal podem ser classificados como:

Resíduos livres: caracterizam-se pelo princípio ativo administrado e também por seus metabolitos estruturalmente relacionados (epímeros, produtos de oxidação, derivados metilados, entre outros) (KINSELLA et al., 2009).

Resíduos conjugados: são aqueles onde o princípio ativo sofre reações de glicosilação enzimática ou de sulfonação (KINSELLA et al., 2009).

Resíduos ligados: são resultantes da ligação entre o princípio ativo e proteínas ou outras biomoléculas (KINSELLA et al., 2009).

O limite máximo de resíduo (LMR) de um determinado composto é a quantidade máxima de resíduo aceita oficialmente em um alimento. As organizações internacionais envolvidas com a saúde pública, como WHO (World Health Organization) e o Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), órgão do Codex Alimentarius, o Food and Drug Administration dos Estados Unidos da América (EUA) e a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), estabelecem valores de limite máximo de resíduo. No Brasil, a competência para estabelecer os limites máximos de resíduos e contaminantes em alimentos é do Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Atualmente, o Brasil utiliza parâmetros estabelecidos pelo Codex Alimentarius, além das bases legais da EMA e do FDA, entre outras agências internacionais (ANVISA, 2018).

3.3.2 Monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários no Brasil

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o principal programa de inspeção e fiscalização da produção de alimentos no Brasil. O objetivo do programa é o monitoramento da efetividade dos controles de risco, qualidade e segurança implementados em diferentes cadeias produtivas, tanto animal como vegetal. No caso do monitoramento das cadeias produtivas de alimentos de origem animal (aves, pescados, suínos, bovinos e equinos) as amostras são oficiais e coletadas por fiscais federais agropecuários em estabelecimentos de abate e

processamento sob a responsabilidade do Serviço de Inspeção Federal (SIF) (MAPA, 2017ª).

Os resultados gerais do subprograma de monitoramento e subprograma exploratório do plano nacional de controle de resíduos e contaminantes apresentou os resultados referentes ao monitoramento de 357 amostras de peixes de cativeiro durante o ano de 2017, para determinação de enrofloxacina, ciprofloxacina, sarafloxacina, difloxacino, ácido nalidíxico, ácido oxolínico, flumequina, cloranfenicol, tianfenicol, florfenicol, sulfametazina, sulfatiazol, sulfadimetoxina, nitrofurazona-SEM, furazolidona-AOZ, furaltadona-AMOZ, nitrofurantoina-AHD, clortetraciclina, tetraciclina, oxitetraciclina. Nenhuma das amostras analisadas apresentou não-conformidade em função dos critérios estabelecidos (MAPA, 2017b).

3.3.3 Monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários na União Europeia

Em 1990 a União Europeia estabeleceu, através do Regulamento (CEE) Nº 2377/90 do Conselho, uma divisão específica para cada situação no que concerne o uso de substâncias químicas como medicamentos veterinários. Desta forma os compostos são divididos da seguinte maneira:

a) Substâncias com LMR estabelecidos;

b) Substâncias que não apresentam nocividade a saúde do consumidor e portanto não LMR estabelecido;

c) Substâncias em estudo que possuem um LMR provisório;

d) Substâncias comprovadamente nocivas em qualquer concentração e, portanto, proibidas.

Para facilitar o entendimento dos requisitos mínimos para determinação de tais compostos, a União Europeia, através do documento (EC) No 470 de 6 de maio de 2009, separou estas substâncias em dois grandes grupos que consistem em: Grupo A (substâncias proibidas que tem o seu uso banido, e substâncias com ação anabolizante); e Grupo B (substâncias que tenham um limite máximo de resíduo estabelecido ou provisório) (KINSELLA et al., 2009; STOLKER & BRINKMAN, 2005).

O RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) é um sistema criado na União Europeia que permite um intercâmbio de informações rápido e eficaz entre os Estados Membros sempre que se detectam riscos para a saúde humana na cadeia

alimentar humana ou animal. Se for identificado um risco de perigo num produto alimentício ou em alimento para animais oriundo ou exportado de um país não membro do RASFF, como por exemplo, o Brasil, a Comissão Europeia informa o país em questão. Toda a informação recebida pela Comissão é avaliada e reenviada para todos os membros do RASFF, através de um dos quatro tipos de notificação existentes, a) alerta; b) informação; c) rejeições fronteiriças e 4) informações consideradas interessantes para as autoridades de controle.

De janeiro de 2010 até janeiro de 2019 foram observadas 86 notificações a respeito de resíduos e contaminantes em peixes e produtos da aquicultura. Dentre os resíduos notificados estão os compostos ivermectina (2), neomicina (2), oxitetraciclina (2), cloranfenicol (4), sulfonamidas e trimetoprim (10), verde de malaquita (27), nitrofurazona (32) e outros (7). Vários países exportadores aparecem nas notificações, entre eles Aústria, Bélgica, Chile, Grécia, India, Indonesia, Eslováquia, Turquia, Alemanha, Dinamarca, França, Polônia e China. Entretanto, o país que mais se destaca em termos de notificações é o Vietnam com 59 de 86 notificações. Destacam-se entre as espécies de peixe notificadas a tilápia (11), trutas (12) e *catfish* (49) (RASFF, 2019).

Na União Europeia, os valores de LMR de referência para produtos provenientes da pesca ou aquicultura abrangem uma faixa de concentração entre 0,3 e 1000 µg kg^{-1} de acordo com a Tabela 1 (2010/37/EC). A partir destas concentrações de referência os métodos analíticos são desenvolvidos de acordo com a Decisão 2002/657/EC.

Tabela 1 – Limites máximos de resíduos estabelecidos pela União Europeia para produtos de origem aquicultura para os compostos em estudo.

Princípio ativo	Classe	LMR (µg kg^{-1})
cloranfenicol	anfenicóis	0.3*
florfenicol (florfenicol-amina)	anfenicóis	1000
tianfenicol	anfenicóis	50
diflubenzuron	benzamidas	1000
teflubenzuron	benzamidas	500
eritromicina A (metabólitos)	macrolídeos	200
tilosina A	macrolídeos	100
dimetridazol	nitroimidazóis	
metronidazol	nitroimidazóis	
ronidazol	nitroimidazóis	
deltametrina	piretróides	10

Princípio ativo	Classe	LMR ($\mu g\ kg^{-1}$)
ácido oxolínico	quinolonas	100
sarafloxacina	quinolonas	30
danofloxacina	quinolonas (fluoro)	100
difloxacina	quinolonas (fluoro)	300
enrofloxacina	quinolonas (fluoro)	100
sulfonamidas	sulfonamidas	100
trimetoprim	diaminopirimidina	50
clortetraciclina	tetraciclinas	100
oxitetraciclina	tetraciclinas	100
tetraciclina	tetraciclinas	100

*Valor referente ao LMDR (Compostos de uso proibido);
N/A – Não Aplicado;
Ausência – Compostos de uso proibido sem LMDR estabelecido.

3.4 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM SALMÃO

3.4.1 Composição das amostras e amostragem

O conhecimento da composição química das amostras a serem avaliadas é de grande importância para o desenvolvimento de métodos analíticos. A escolha das técnicas empregadas na determinação de resíduos de medicamentos veterinários passa pela avaliação dos componentes majoritários da amostra estudada (PRESTES et al., 2013). Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, o salmão sem pele, fresco e cru tem em sua composição 69% de umidade, 19% de proteínas e 10% de lipídeos, sendo que destes 8,5% são ácidos graxos (TACO, 2011). Uma vez que se buscam componentes em concentrações na ordem de mg ou $\mu g\ kg^{-1}$, proteínas e lipídeos podem estar diretamente vinculados a diminuição de sinal analítico, avarias nos instrumentos, baixas taxas de recuperação, entre outros (BANDEIRA et al., 2017; MAY et al., 2016; ORSO et al., 2016).

De acordo com o MAPA, a amostragem deve ser realizada através da coleta de músculo de peixe ou, na impossibilidade de realizar o processo de filetagem, de peixe inteiro e viscerado e sem cabeça. A amostra deve ser acondicionada em um envoltório plástico (embalagem primária) e a embalagem deverá ser lacrada. Acondiciona-se esta embalagem no interior de outro envoltório plástico (embalagem secundária) e este também deverá ser lacrado. Depois de acondicionada, a amostra

será congelada e colocada hermeticamente em meio refrigerante em caixa isotérmica adequada. Assim, proporciona-se as condições necessárias para que a amostra chegue ao laboratório de destino em condições adequadas para a realização das análises. Os critérios de aceitabilidade para produtos da aquicultura para a análise de resíduos de medicamentos veterinários exigem que as amostras cheguem nos laboratórios congeladas. Somente para a análise de sulfonamidas amostras descongeladas frias são aceitáveis (MAPA, 2017a).

3.4.2 Preparo de amostras para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em peixe

Em se tratando da determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de origem animal o preparo de amostras tem como objetivo isolar os compostos de interesse e remover interferentes da provenientes da amostra. Geralmente, as amostras de músculo de peixe são submetidas a extrações com solventes utilizando diferentes procedimentos de homogeneização. Pode-se ainda realizar uma etapa de limpeza visando remover interferentes, que afetam os sistemas de análise, através de diferentes métodos e técnicas. Ainda, etapas de pré-concentração podem ser aplicadas visando o aumento da concentração dos analitos-alvo no extrato a níveis acima dos LODs e LOQs da técnica analítica (PRESTES et al., 2013). O desenvolvimento de métodos que visam a determinação de multiplas classes de medicamentos veterinários tem aumentado nos últimos 10 anos devido a ampla aplicabilidade de sistemas cromatográficos acoplados a espectrometria de massas (PRESTES et al., 2013; SANTOS & RAMOS, 2016). Porém, constituintes da amostra presentes no extrato podem promover distorção de espectros, supressão e aumento do sinal analítico, afetando o desempenho das técnicas de separação, ionização e da espectrometria de massas. O preparo de amostra auxilia na obtenção de resultados confiáveis e no desempenho do instrumento, sendo essencial no processo analítico (PRESTES et al., 2013; SANTOS & RAMOS, 2016).

Geralmente, a extração de resíduos de medicamentos veterinários de amostras de peixe é realizada utilizando solventes como água, acetonitrila, metanol e acetato de etila. Entretanto, mudanças de pH, tamponamento e adição de agentes complexantes e sais são normalmente empregados devido às características de cada

uma das classes de compostos a ser determinada (DMITRIENKO et al., 2014; FAROUK et al., 2015; ÖNAL, 2011; SANTOS & RAMOS, 2016).

Para a extração de compostos de maior solubilidade em água ou ácidos e que tenham estabilidade em soluções de pH baixo o uso de soluções ácidas na etapa de extração pode aumentar a eficiência de extração (GBYLIK et al., 2013; KAUFMANN et al., 2012). A adição de ácidos muitas vezes está associada a diminuição das interações entre os compostos de interesse e os componentes da amostra. Isto ocorre devido o equilíbrio de dissociação de algumas classes favorecer a formação de moléculas neutras (para ácidos) e protonadas (para bases) em valores ácidos de pH, dificultando interações e ligações com os componentes da amostra (DASENAKI & THOMAIDIS, 2010). Na determinação de multiplas classes de medicamentos, extrações com ácidos e posteriormente com solventes orgânicos podem vir a garantir a eficiência de extração de todas classes independente de sua polaridade ou estabilidade em meios ácidos (GBYLIK et al., 2013). Os ácidos ainda podem ser utilizados na precipitação de proteínas, auxiliando na limpeza do extrato de amostras de origem animal (GUIDI et al., 2017).

Os ácidos normalmente empregados são o ácido fosfórico, meta-fosfórico, fórmico, cítrico, acético, heptafluorobutírico e tricloroacético. Na literatura, diferentes autores reportam condições ácidas de extração para a análise de aminoglicosídeos (GBYLIK et al., 2013; GUIDI et al., 2017; KAUFMANN et al., 2012), anfenicóis (MONTEIRO et al., 2015), beta-lactâmicos (GBYLIK et al., 2013; GUIDI et al., 2017; TANG et al., 2012), cefalosporinas (DONE & HALDEN, 2015), lincosamidas (TANG et al., 2012), macrolídeos (DONE & HALDEN, 2015; GBYLIK et al., 2013; GUIDI et al., 2017; TANG et al., 2012), penicilinas (DONE & HALDEN, 2015), quinolonas (DONE & HALDEN, 2015; GBYLIK et al., 2013; GUIDI et al., 2017; LOHNE et al., 2012; MONTEIRO et al., 2015; TANG et al., 2012; ZHANG et al., 2010), sulfonamidas (DASENAKI; THOMAIDIS, 2010; DONE & HALDEN, 2015; GBYLIK et al., 2013; GUIDI et al., 2017; JANSOMBOON et al., 2016; LI et al., 2016b; MONTEIRO et al., 2015) e tetraciclinas (DASENAKI; THOMAIDIS, 2010; DONE & HALDEN, 2015; GBYLIK et al., 2013; GUIDI et al., 2017; LIU et al., 2013; MONTEIRO et al., 2015; ORLANDO & SIMIONATO, 2013).

Condições de extração em pH básico também foram reportadas para determinação de anfenicóis em métodos multirresíduo (SERRA-COMPTE et al., 2016)

e também por promover aumento da eficiência de extração de metabólitos (BARRETO et al., 2016) e

O pH da solução utilizada na etapa de extração está diretamente associado a eficiência desta etapa (TANG et al., 2012). Sendo assim, o valor ótimo de pH para que todos os compostos possam ser completamente extraídos pode ser controlado através da adição de soluções tampão. A adição destas soluções é necessária caso compostos sensíveis ao pH , como macrolídeos e penicilinas sejam os analitos de interesse (KAUFMANN et al., 2011). Soluções de tampão fosfato (ácido fosfórico e fosfato mono ou di sódico) foram reportadas para a extração de benzimidazóis (KAUFMANN et al., 2011), beta-lactâmicos (TANG et al., 2012), cefalosporinas (DONE & HALDEN, 2015; KAUFMANN et al., 2011), lincosamidas (DICKSON, 2014; TANG et al., 2012), macrolídeos (DICKSON, 2014; DONE & HALDEN, 2015; KAUFMANN et al., 2011; TANG et al., 2012), nitroimidazóis (KAUFMANN et al., 2011), penicilinas (DONE & HALDEN, 2015; KAUFMANN et al., 2011), quinolonas (DONE & HALDEN, 2015; KAUFMANN et al., 2011; TANG et al., 2012; ZHANG et al., 2010), sulfonamidas (CHÁFER-PERICÁS et al., 2011; DONE & HALDEN, 2015; KAUFMANN et al., 2011), tetraciclinas (CHÁFER-PERICÁS et al., 2011; DONE & HALDEN, 2015; KAUFMANN et al., 2011; ORLANDO & SIMIONATO, 2013) e tranquilizantes (KAUFMANN et al., 2011).

A adição de agentes complexantes, como por exemplo o EDTA, durante a etapa de extração é essencial para a determinação de tetraciclinas, uma vez que esta classe é conhecida pela facilidade na formação de complexos com cátions bi e trivalentes presentes na amostra (CHÁFER-PERICÁS et al., 2010; FREITAS et al., 2014; ORLANDO & SIMIONATO, 2013). Comportamento semelhante é relatado durante a determinação de Asquinolonas que podem formar complexos com alguns metais (LOHNE et al., 2012). No caso dos aminoglicosídeos, grupos amino adjacentes também são capazes de formar complexos (KAUFMANN et al., 2012).

Visando o aumento da eficiência na etapa de extração a adição de sais que promovem o efeito *salting-out* também é utilizada na determinação de resíduos de medicamentos veterinários. Normalmente são empregados cloreto ou acetato de sódio e ainda sulfato de sódio, magnésio ou amônio. Entretanto, o uso de sulfato de magnésio pode causar diminuição da eficiência de extração das tetraciclinas, quinolonas e aminoglicosídeos devido a sua conhecida capacidade de complexação com íons Mg^{2+} (GADAJ et al., 2014; KAUFMANN et al., 2011; LI et al., 2016; LOHNE

et al., 2012; ORLANDO & SIMIONATO, 2013; SERRA-COMPTE et al., 2016; TANG et al., 2012).

Além das técnicas de extração por radiação microondas (AUFARTOVÁ et al., 2017; HUANG et al., 2016), ultrassom (DASENAKI; THOMAIDIS, 2010; DONE & HALDEN, 2015; JANSOMBOON et al., 2016; ORLANDO & SIMIONATO, 2013; SERRA-COMPTE et al., 2016; ZHANG et al., 2010) e extração por solvente pressurizado (LIU et al., 2013) a técnica de dispersão da matriz em fase sólida também pode ser aplicada na extração de resíduos de medicamentos no caso de amostras sólidas, como músculo de peixe, e pastosas (PAN et al., 2015; TAO et al., 2012).

A Tabela 2 apresenta uma revisão de métodos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em peixe a partir de 2010.

Tabela 2 – Revisão de métodos de homogeneização, solventes, pH de extração, solução tampão, agentes complexantes e sais de partição utilizados no preparo de amostras de peixes para determinação de resíduos de medicamentos veterinários

Analitos	Homogeneização	Solventes	pH	Solução tampão	Agente Complexante	Partição	Referência
Aminoglicosídeos	Ultra-turrax	Água	Ácido (TCA 5%)	-	-	-	(GUIDI et al., 2017)
	Agitação Mecânica	Água	Ácido (Ácido fosfórico 3%/ Heptafluorbutirico 0,02 M/ TCA 20%)	-	-	-	(GBYLIK et al., 2013)
	Ultra-turrax	Água	Ácido (TCA 5%)	-	EDTA (7,5%)	-	(KAUFMANN ET AL., 2012)
Anfenicóis	Agitação Mecânica	Água/ Acetonitrila/ Metanol	-	-	-	Sulfato de magnésio/ Acetato de sódio	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	Ultrassom	Água	Básico (NaOH 0,1 M)	-	-	Cloreto de Sódio	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	Ultra-turrax	Acetato de etila	Básico (NH4OH 2%)	-	-	-	(BARRETO et al., 2016)
	Micro-ondas	Metanol/Acetonitrila/Acetato de Etila	-	-	-	-	(HUANG et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Acetonitrila	-	-	-	-	(BARRETO et al., 2012)
	Ultrassom	Água/Acetonitrila	-	-	EDTA 0,01 M	-	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Acetonitrila	-	-	EDTA 0,01 M	-	(SANTOS et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Água/Metanol	-	-	EDTA 0,01 M	-	(YIPEL et al., 2016)
	Ultra-turrax	Acetonitrila/ Água	Ácido (Ácido fórmico 0,1%)	-	EDTA 0,01 M	-	(MONTEIRO et al., 2015)
	Agitação Mecânica	Água/ Acetonitrila/ Metanol	-	-	EDTA 0,01 M	-	(FREITAS et al., 2014)
Benzimidazóis	Ultra-turrax	Água/ Acetonitrila	-	Ácido Succinico (0,6%)	EDTA	Sulfato de Amônio	(KAUFMANN et al., 2011)
Beta-lactâmicos	Agitação Mecânica	Água/ Metanol	Ácido (Ácido metafosfórico)	NaH_2PO_4/Na_2HPO_4	-	Cloreto de Sódio	(TANG et al., 2012)
	Ultra-turrax	Água	Ácido (TCA 5%)	-	-	-	(GUIDI et al., 2017)
Beta-lactâmicos	Agitação Mecânica	Água	Ácido (Ácido fosfórico 3%/ Heptafluorbutirico 0,02 M/ TCA 20%)	-	-	-	(GBYLIK et al., 2013)

Analitos	Homogeneização	Solventes	pH	Solução tampão	Agente Complexante	Partição	Referência
Cefalosporinas	Ultra-turrax	Água/ Acetonitrila	-	Ácido Succinico (0,6%)	EDTA	Sulfato de Amônio	(KAUFMANN et al., 2011)
	Agitação Mecânica	Acetonitrila	-	-	-	-	(REINHOLDS et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Acetonitrila	-	-	-	-	(YIPEL et al., 2016)
	Ultrassom	Acetonitrila	Ácido (H_3PO_4 85%)	NaH_2PO_4 (0,17 M)	EDTA (500 mg)	-	(DONE & HALDEN, 2015)
	Agitação Mecânica	Água/Metanol	-	-	EDTA 0,1 M	-	(YIPEL et al., 2016)
Corantes	Micro-ondas	Metanol/Acetonitrila/Acetato de Etila	-	-	-	-	(HUANG et al., 2016)
Lincosamidas	Agitação Mecânica	Água/ Acetonitrila/ Metanol	-	-	-	Sulfato de magnésio/ Acetato de sódio	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	Ultrassom	Água	Básico (NaOH 0,1 M)	-	-	Cloreto de Sódio	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Água/ Metanol	Ácido (Ácido metafosfórico)	NaH_2PO_4/Na_2HPO_4	-	Cloreto de Sódio	(TANG et al., 2012)
	Esferas metálicas e agitação mecânica	Acetonitrila/ Água	-	NaH_2PO_4	-	-	(DICKSON, 2014)
	Ultrassom	Água/Acetonitrila	-	-	EDTA 0,01 M	-	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
Macrolídeos	Agitação Mecânica	Água/ Acetonitrila/ Metanol	-	-	-	Sulfato de magnésio/ Acetato de sódio	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	Ultra-turrax	Água/ Acetonitrila	-	Ácido Succinico (0,6%)	EDTA	Sulfato de Amônio	(KAUFMANN et al., 2011)
	Ultrassom	Água	Básico (NaOH 0,1 M)	-	-	Cloreto de Sódio	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Água/ Metanol	Ácido (Ácido metafosfórico)	NaH_2PO_4/Na_2HPO_4	-	Cloreto de Sódio	(TANG et al., 2012)
	Ultra-turrax	Água	Ácido (TCA 5%)	-	-	-	(GUIDI et al., 2017)
	Agitação Mecânica	Acetonitrila	-	-	-	-	(REINHOLDS et al., 2016)
	Esferas metálicas e agitação mecânica	Acetonitrila/ Água	-	NaH_2PO_4	-	-	(DICKSON, 2014)
Macrolídeos	Agitação Mecânica	Água	Ácido (Ácido fosfórico 3%/ Heptafluorbutirico 0,02 M/ TCA 20%)	-	-	-	(GBYLIK et al., 2013)
	Ultrassom	Acetonitrila	Ácido (H_3PO_4 85%)	NaH_2PO_4 (0,17 M)	EDTA (500 mg)	-	(DONE & HALDEN, 2015)

Analitos	Homogeneização	Solventes	pH	Solução tampão	Agente Complexante	Partição	Referência
	Ultrassom	Água/Acetonitrila	-	-	EDTA 0,01 M	-	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Acetonitrila	-	-	EDTA 0,1 M	-	(SANTOS et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Água/Metanol	-	-	EDTA 0,1 M	-	(YIPEL et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Água/ Acetonitrila/ Metanol	-	-	EDTA 0,1 M	-	(FREITAS et al., 2014)
Nitroimidazóis	Ultra-turrax	Acetonitrila/ Água	-	-	-	Sulfato de magnésio/ Cloreto de sódio	(GADAJ et al., 2014)
	Agitação Mecânica	Água/ Acetonitrila/ Metanol	-	-	-	Sulfato de magnésio/ Acetato de sódio	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	Ultra-turrax	Água/ Acetonitrila	-	Ácido Succinico (0,6%)	EDTA	Sulfato de Amônio	(KAUFMANN et al., 2011)
	Ultrassom	Água	Básico (NaOH 0,1 M)	-	-	Cloreto de Sódio	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	Micro-ondas	Metanol/Acetonitrila/Acetato de Etila	-	-	-	-	(HUANG et al., 2016)
	Ultrassom	Água/Acetonitrila	-	-	EDTA 0,01 M	-	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
Penicilinas	Ultra-turrax	Água/ Acetonitrila	-	Ácido Succinico (0,6%)	EDTA	Sulfato de Amônio	(KAUFMANN et al., 2011)
	Agitação Mecânica	Acetonitrila	-	-	-	-	(REINHOLDS et al., 2016)
	Ultrassom	Acetonitrila	Ácido (H_3PO_4 85%)	NaH_2PO_4 (0,17 M)	EDTA (500 mg)	-	(DONE & HALDEN, 2015)
	Agitação Mecânica	Acetonitrila	-	-	EDTA 0,1 M	-	(SANTOS et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Água/Metanol	-	-	EDTA 0,1 M	-	(YIPEL et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Água/ Acetonitrila/ Metanol	-	-	EDTA 0,1 M	-	(FREITAS et al., 2014)
Quinolonas	Ultra-turrax	Água/ Acetonitrila	-	Ácido Succinico (0,6%)	EDTA	Sulfato de Amônio	(KAUFMANN et al., 2011)
	Agitação Mecânica	Água/ Acetonitrila	Ácido (Ácido acético 1%)	-	-	Cloreto de Sódio	(LOHNE et al., 2012)
Quinolonas	Agitação Mecânica	Água/ Metanol	Ácido (Ácido metafosfórico)	NaH_2PO_4/Na_2HPO_4	-	Cloreto de Sódio	(TANG et al., 2012)
	Micro-ondas	Metanol	-	-	-	-	(AUFARTOVÁ et al., 2017)
	Ultra-turrax	Água	Ácido (TCA 5%)	-	-	-	(GUIDI et al., 2017)

Analitos	Homogeneização	Solventes	pH	Solução tampão	Agente Complexante	Partição	Referência
	Agitação Mecânica	Acetonitrila	-	-	-	-	(REINHOLDS et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Água	Ácido (Ácido fosfórico 3%/ Heptafluorbutirico 0,02 M/ TCA 20%)	-	-	-	(GBYLIK et al., 2013)
	Ultrassom	Água	Ácido cítrico (0,1 M)	McIlvaine	-	-	(ZHANG et al., 2010)
	Ultrassom	Acetonitrila	Ácido (H_3PO_4 85%)	NaH_2PO_4 (0,17 M)	EDTA (500 mg)	-	(DONE & HALDEN, 2015)
	Agitação Mecânica	Acetonitrila	-	-	EDTA 0,1 M	-	(SANTOS et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Água/Metanol	-	-	EDTA 0,1 M	-	(YIPEL et al., 2016)
	Ultra-turrax	Acetonitrila/ Água	Ácido (Ácido fórmico 0,1%)	-	EDTA 0,1 M	-	(MONTEIRO et al., 2015)
	Agitação Mecânica	Água/ Acetonitrila/ Metanol	-	-	EDTA 0,1 M	-	(FREITAS et al., 2014)
Sulfonamidas	Agitação Manual	Acetonitrila	Ácido (Ácido fórmico 0,1%)	-	-	Sulfato de magnésio/ Cloreto de sódio	(LI et al., 2016b)
	Agitação Mecânica	Água/ Acetonitrila/ Metanol	-	-	-	Sulfato de magnésio/ Acetato de sódio	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	Ultra-turrax	Água/ Acetonitrila	-	Ácido Succinico (0,6%)	EDTA	Sulfato de Amônio	(KAUFMANN et al., 2011)
	Ultrassom	Água	Básico (NaOH 0,1 M)	-	-	Cloreto de Sódio	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	Ultra-turrax	Água	Ácido (TCA 5%)	-	-	-	(GUIDI et al., 2017)
	Ultrassom	Acetonitrila/Metanol	Ácido (Ácido fórmico 0,05%)	-	-	-	(JANSOMBOON et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Acetonitrila	-	-	-	-	(REINHOLDS et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Água	Ácido (Ácido fosfórico 3%/ Heptafluorbutirico 0,02 M/ TCA 20%)	-	-	-	(GBYLIK et al., 2013)
Sulfonamidas	Ultrassom	Acetonitrila/ Metanol	Ácido (Ácido fórmico 0,2%)	-	-	-	(DASENAKI & THOMAIDIS, 2010).
	Ultrassom	Acetonitrila	Ácido (H_3PO_4 85%)	NaH_2PO_4 (0,17 M)	EDTA (500 mg)	-	(DONE & HALDEN, 2015)
	Ultrassom	Água/Acetonitrila	-	-	EDTA 0,01 M	-	(SERRA-COMPTE et al., 2016)

Analitos	Homogeneização	Solventes	pH	Solução tampão	Agente Complexante	Partição	Referência
	Agitação Mecânica	Acetonitrila	-	-	EDTA 0,1 M	-	(SANTOS et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Água/Metanol	-	-	EDTA 0,1 M	-	(YIPEL et al., 2016)
	Ultra-turrax	Acetonitrila/ Água	Ácido (Ácido fórmico 0,1%)	-	EDTA 0,1 M	-	(MONTEIRO et al., 2015)
	Agitação Mecânica	Água/ Acetonitrila/ Metanol	-	-	EDTA 0,1 M	-	(FREITAS et al., 2014)
	Ultra-turrax	Água/ Metanol	-	PBS-T	EDTA 0,1 M	-	(CHÁFER-PERICÁS et al., 2011)
	Ultra-turrax	Água/ Metanol	-	-	EDTA 0,1 M	-	(CHÁFER-PERICÁS et al., 2010)
Tetraciclinas	Agitação Mecânica	Acetonitrila	Ácido (Ácido acético 2%)	Acetato	-	Sulfato de sódio/ Acetato de sódio	(ORLANDO & SIMIONATO, 2013)
	Agitação Mecânica	Água/ Acetonitrila/ Metanol	-	-	-	Sulfato de magnésio/ Acetato de sódio	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	Ultra-turrax	Água/ Acetonitrila	-	Ácido Succinico (0,6%)	EDTA	Sulfato de Amônio	(KAUFMANN et al., 2011)
	Ultrassom	Água	Básico (NaOH 0,1 M)	-	-	Cloreto de Sódio	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	Ultrassom	Acetonitrila/ n-Hexano	-	-	-	Cloreto de Sódio	(ORLANDO & SIMIONATO, 2013)
	Ultra-turrax	Água	Ácido (TCA 5%)	-	-	-	(GUIDI et al., 2017)
	Agitação Mecânica	Acetonitrila	-	-	-	-	(REINHOLDS et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Água	Ácido (Ácido fosfórico 3%/ Heptafluorbutirico 0,02 M/ TCA 20%)	-	-	-	(GBYLIK et al., 2013)
	Ultrassom	Acetonitrila/ Metanol	Ácido (Ácido fórmico 0,2%)	-	-	-	(DASENAKI & THOMAIDIS, 2010).
	Agitação Mecânica	Água	Ácido (TCA 20%)	McIlvaine	EDTA	-	(ORLANDO & SIMIONATO, 2013)
	Extração com solvente pressurizado	Metanol	Ácido (TCA 1 mM)	-	EDTA (5 g)	-	(LIU et al., 2013)
	Ultrassom	Acetonitrila	Ácido (H_3PO_4 85%)	NaH_2PO_4 (0,17 M)	EDTA (500 mg)	-	(DONE & HALDEN, 2015)
Tetraciclinas	Ultrassom	Água/Acetonitrila	-	-	EDTA 0,01 M	-	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Acetonitrila	-	-	EDTA 0,1 M	-	(SANTOS et al., 2016)
	Agitação Mecânica	Água/Metanol	-	-	EDTA 0,1 M	-	(YIPEL et al., 2016)

Analitos	Homogeneização	Solventes	pH	Solução tampão	Agente Complexante	Partição	Referência
	Ultra-turrax	Acetonitrila/ Água	Ácido (Ácido fórmico 0,1%)	-	EDTA 0,1 M	-	(MONTEIRO et al., 2015)
	Agitação Mecânica	Água/ Acetonitrila/ Metanol	-	-	EDTA 0,1 M	-	(FREITAS et al., 2014)
	Ultra-turrax	Água/ Metanol	-	PBS-T	EDTA 0,1 M	-	(CHÁFER-PERICÁS et al., 2011)
	Ultra-turrax	Água/ Metanol	-	-	EDTA 0,1 M	-	(CHÁFER-PERICÁS et al., 2010)
Tranquilizantes	Ultra-turrax	Água/ Acetonitrila	-	Ácido Succinico (0,6%)	EDTA	Sulfato de Amônio	(KAUFMANN et al., 2011)

Com a finalidade de retirar componentes indesejados do extrato da matriz uma etapa adicional de limpeza pode ser realizada. Esta etapa pode auxiliar na diminuição do efeito de matriz, problemas de eluição e entupimento de pré-coluna, coluna e tubulações, aumentando a confiabilidade da análise e diminuindo a frequência de manunteções no instrumento. Entretanto, a adição de outra etapa no método pode aumentar a probabilidade de erro e diminuir a eficiência do processo, resultando em baixas recuperações (PRESTES et al., 2013).

Entre as opções de limpeza destacam-se as técnicas de extração líquido-líquido utilizando solventes de baixa polaridade como hexano (BARRETO et al., 2016; GADAJ et al., 2014; LI et al., 2016; ORLANDO & SIMIONATO, 2013) ou clorofórmio (BARRETO et al., 2012) e a extração em fase sólida dispersiva utilizada no método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) (ORLANDO & SIMIONATO, 2013; SERRA-COMPTE et al., 2016).

O uso de hexano e clorofórmio na etapa de limpeza pode simplificar e diminuir o tempo de realização do procedimento de extração quando comparado com a extração em fase sólida dispersiva. Entretanto, são usados somente para remover interferentes menos polares da matriz como lipídios e gorduras (BARRETO et al., 2012, 2016; GADAJ et al., 2014; ORLANDO & SIMIONATO, 2013). Por outro lado, a extração em fase sólida dispersiva pode ser aplicada utilizando sorventes, como amina primária-secundária (PSA) e octadecil-silano (C18), ou, ainda, resinas poliaromáticas (ORLANDO & SIMIONATO, 2013; SERRA-COMPTE et al., 2016).

Neste mesmo contexto, técnicas de microextração líquido-líquido dispersiva também podem ser utilizadas visando a limpeza de extratos provenientes de amostras sólidas (HUANG et al., 2016).

Entretanto, a grande maioria das aplicações utiliza a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) em cartucho para promover a etapa de limpeza dos extratos. Diversos trabalhos na literatura relatam o uso da SPE empregando diferentes sorventes como por exemplo Bond Elut Plexa (FREITAS et al., 2014), C18 (DICKSON, 2014), octadecil-silanos (FREITAS et al., 2014; KAUFMANN et al., 2011; KAUFMANN et al., 2012; ORLANDO & SIMIONATO, 2013; ZHANG et al., 2010), Evolute ABN (FREITAS et al., 2014), Oasis HLB (AUFARTOVÁ et al., 2017; DONE & HALDEN, 2015; FREITAS et al., 2014; KAUFMANN et al., 2011; ORLANDO & SIMIONATO, 2013; SERRA-COMPTE et al., 2016), Oasis MCX (FREITAS et al., 2014), fenil (FREITAS et al., 2014) e Phree phospho-lipid (REINHOLDS et al., 2016).

Entre as vantagens da SPE estão os altos percentuais de recuperação e a possibilidade de pré-concentração, baixo consumo de solventes orgânicos, facilidade de operação e possibilidade de automação. Por outro lado, a SPE requer tempo elevado para realização do procedimento e analistas treinados para realização das operações com repetibilidade adequada. Além disso, há um gasto alto envolvido na aquisição dos cartuchos que muitas vezes são específicos para apenas uma classe de compostos (NOVÁKOVÁ & VLČKOVÁ, 2009).

3.4.3 Determinação de resíduos de medicamentos veterinários por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A técnica preferencial para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de peixe é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry*) ou LC acoplada a espectrômetros de massas de alta resolução (HRMS, do inglês *High Resolution Mass Spectrometry*). O acoplamento destas duas técnicas permite a determinação de mais de uma classe de medicamento simultaneamente. Ou seja, mais de um sinal analítico pode ser monitorado enquanto mais de um composto é eluído da coluna. A quantidade de dados adquirida é incomparável com métodos espectrofotométricos de detecção, por exemplo. Neste contexto, os métodos multiressíduo estão ganhando espaço na determinação de resíduos de medicamentos de uso veterinário. Estes métodos representam o futuro deste campo, sendo limitados apenas pelo processo de extração, uma vez que é notável a dificuldade de proporcionar recuperações aceitáveis (70-120%) de analitos com distintas propriedades físico-químicas (SANTOS & RAMOS, 2016).

A Tabela 3 apresenta diferentes métodos cromatográficos para a determinação de diversas classes de medicamentos veterinários. Todos os métodos apresentados na Tabela 4 utilizam o modo de fase-reversa com colunas cromatográficas contendo recheios diferentes e dimensões variadas. Percebe-se que os volumes de injeção utilizados variam entre 1 e 50 µL, a temperatura da coluna varia entre 25 e 60 °C, com vazões entre 0,1 e 1,0 mL min^{-1}, e tempos totais de análise cromatográfica entre 3,7 e 33,0 min. Os solventes orgânicos empregados como fase móvel são acetonitrila e metanol. Por fim, ácido heptafluorbutírico, ácido fórmico, formiato de amônio, acetato de amônio e ácido oxálico são utilizados como aditivos, visando melhorar a separação e o formato dos picos e auxiliar na formação de íons pseudo-moleculares na fonte de ionização.

Tabela 3 – Volumes de injeção, colunas, temperaturas da coluna, fase móvel, vazão e tempo total de análise cromatográfica aplicadas na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de peixe.

Analitos	Volume de injeção (µL)	Coluna	Temperatura (ºC)	Fase móvel aquosa	Fase móvel orgânica	Vazão (mL min^{-1})	Tempo (min)	Referência
Aminoglicosídeos	5	C18 (150 x 2,1 mm, 2,6 µm)	25	Água (5% Acetonitrila) 0,13% ácido heptafluorobutírico	Acetonitrila (5% Água) 0,13% ácido heptafluorobutírico	0,3	9	(KAUFMANN ET AL., 2012)
	-	C18 (50 x 4,6 mm, 3 µm)	35	Água 0,025% ácido heptafluorobutirico	Acetonitrila	0,25	18	(GBYLIK et al., 2013)
	10	C18 (XDB) (150 x 4,6 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,1% ácido heptafluorobutirico	Acetonitrila	0,6	15	(GUIDI et al., 2017)
Anfenicóis	20	C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	-	Água	Acetonitrila	0,8	10	(BARRETO et al., 2012)
	10	C18 (BEH) (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	40	Água	Metanol	0,4	5	(PAN et al., 2015)
	5	Fenil (BEH) (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	30	Água 0,05 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,3	4	(HUANG et al., 2016)
	20	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	40	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,45	12	(FREITAS et al., 2014)
	10	C18 (100 x 3 mm, 3,5 µm)	30	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila 0,1 % ácido fórmico	0,4	25	(MONTEIRO et al., 2015)
	20	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	40	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,45	12	(SANTOS et al., 2016)
	10	C18 (150 x 2,1 mm, 5 µm)	40	Água 0,1 % ácido fórmico, 5 mM acetato de amônio	Metanol	0,2	21	(TAO et al., 2012)
	20	C18 (50 x 2 mm, 2,5 µm)	-	Água 0,2% Ácido fórmico 0,1 mM ácido oxálico	Acetonitrila 0,2% Ácido fórmico 0,1 mM ácido oxálico	0,3	7,2	(YIPEL et al., 2016)
	10	C18 (Xterra) (5 x 2,1 mm, 1,7 µm)	40	Água 2 mM Acetato de amônio	Acetonitrila 2 mM Acetato de amônio	0,3	10	(BARRETO et al., 2016)
	5	C18 (BEH) (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	-	Água 5 mM Acetato de amônio pH 8	Acetonitrila	0,5	3,7	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
Benzimidazóis	10	C18 (150 x 2,1 mm, 2,6 µm)	25	Água (5% Acetonitrila) 0,3% ácido fórmico	Acetonitrila (5% Água) 0,3% ácido fórmico	0,4-0,8	14	(KAUFMANN et al., 2011)
Beta-lactâmicos	-	C18 (50 x 4,6 mm, 3 µm)	36	Água 0,025% ácido heptafluorobutirico	Acetonitrila	0,25	18	(GBYLIK et al., 2013)
	10	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,05% ácido fórmico	Acetonitrila	0,3	20	(TANG et al., 2012)
	10	C18 (XDB) (150 x 4,6 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,1% ácido heptafluorobutirico	Acetonitrila	0,6	15	(GUIDI et al., 2017)

Analitos	Volume de injeção (µL)	Coluna	Temperatura (ºC)	Fase móvel aquosa	Fase móvel orgânica	Vazão (mL min^{-1})	Tempo (min)	Referência
Cefalosporinas	10	C18 (150 x 2,1 mm, 2,6 µm)	25	Água (5% Acetonitrila) 0,3% ácido fórmico	Acetonitrila (5% Água) 0,3% ácido fórmico	0,4-0,8	14	(KAUFMANN et al., 2011)
	10	(100 x 2,1 mm, 1,9 µm)	30	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila 0,1 % ácido fórmico	0,3	15	(REINHOLDS et al., 2016)
	10	C18	-	Água 0,1 % ácido fórmico, 0,1% formiato de amônio	Metanol:Acetonitrila	0,15	33	(DONE & HALDEN, 2015)
	20	C18 (50 x 2 mm, 2,5 µm)	-	Água 0,2% Ácido fórmico 0,1 mM ácido oxálico	Acetonitrila 0,2% Ácido fórmico 0,1 mM ácido oxálico	0,3	7,2	(YIPEL et al., 2016)
Corantes	5	Fenil (BEH) (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	30	Água 0,05 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,3	4	(HUANG et al., 2016)
Lincosamidas	10	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,05% ácido fórmico	Acetonitrila	0,3	20	(TANG et al., 2012)
	5	C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 µm)	40	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,2	21	(DICKSON, 2014)
	5	HSS T3 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,5	6	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
Macrolídeos	10	C18 (150 x 2,1 mm, 2,6 µm)	25	Água (5% Acetonitrila) 0,3% ácido fórmico	Acetonitrila (5% Água) 0,3% ácido fórmico	0,4-0,8	14	(KAUFMANN et al., 2011)
	-	C18 (50 x 4,6 mm, 3 µm)	38	Água 0,025% ácido heptafluorobutirico	Acetonitrila	0,25	18	(GBYLIK et al., 2013)
	10	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,05% ácido fórmico	Acetonitrila	0,3	20	(TANG et al., 2012)
	5	C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 µm)	40	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,2	21	(DICKSON, 2014)
	20	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	40	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,45	12	(FREITAS et al., 2014)
	10	(100 x 2,1 mm, 1,9 µm)	30	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila 0,1 % ácido fórmico	0,3	15	(REINHOLDS et al., 2016)
	20	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	40	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,45	12	(SANTOS et al., 2016)
	5	HSS T3 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,5	6	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	10	C18	-	Água 0,1 % ácido fórmico, 0,1% formiato de amônio	Metanol:Acetonitrila	0,15	33	(DONE & HALDEN, 2015)
	10	C18 (XDB) (150 x 4,6 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,1% ácido heptafluorobutirico	Acetonitrila	0,6	15	(GUIDI et al., 2017)
	20	C18 (50 x 2 mm, 2,5 µm)	-	Água 0,2% Ácido fórmico 0,1 mM ácido oxálico	Acetonitrila 0,2% Ácido fórmico 0,1 mM ácido oxálico	0,3	7,2	(YIPEL et al., 2016)
Nitroimidazóis	10	C18 (150 x 2,1 mm, 2,6 µm)	25	Água (5% Acetonitrila) 0,3% ácido fórmico	Acetonitrila (5% Água) 0,3% ácido fórmico	0,4-0,8	14	(KAUFMANN et al., 2011)

Analitos	Volume de injeção (µL)	Coluna	Temperatura (ºC)	Fase móvel aquosa	Fase móvel orgânica	Vazão (mL min^{-1})	Tempo (min)	Referência
Nitroimidazóis	10	C18 (BEH) (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	60	Água 0,01 % ácido fórmico	Metanol 0,01 % ácido fórmico	0,45	8	(GADAJ et al., 2014)
	5	Fenil (BEH) (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	30	Água 0,05 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,3	4	(HUANG et al., 2016)
	5	HSS T3 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,5	6	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
Penicilinas	10	C18 (150 x 2,1 mm, 2,6 µm)	25	Água (5% Acetonitrila) 0,3% ácido fórmico	Acetonitrila (5% Água) 0,3% ácido fórmico	0,4-0,8	14	(KAUFMANN et al., 2011)
	20	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	40	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,45	12	(FREITAS et al., 2014)
	10	(100 x 2,1 mm, 1,9 µm)	30	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila 0,1 % ácido fórmico	0,3	15	(REINHOLDS et al., 2016)
	20	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	40	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,45	12	(SANTOS et al., 2016)
	10	C18	-	Água 0,1 % ácido fórmico, 0,1% formiato de amônio	Metanol:Acetonitrila	0,15	33	(DONE & HALDEN, 2015)
	20	C18 (50 x 2 mm, 2,5 µm)	-	Água 0,2% Ácido fórmico 0,1 mM ácido oxálico	Acetonitrila 0,2% Ácido fórmico 0,1 mM ácido oxálico	0,3	7,2	(YIPEL et al., 2016)
Quinolonas	10	C18 (150 x 2,1 mm, 2,6 µm)	25	Água (5% Acetonitrila) 0,3% ácido fórmico	Acetonitrila (5% Água) 0,3% ácido fórmico	0,4-0,8	14	(KAUFMANN et al., 2011)
	-	C18 (50 x 4,6 mm, 3 µm)	37	Água 0,025% ácido heptafluorobutirico	Acetonitrila	0,25	18	(GBYLIK et al., 2013)
	10	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,05% ácido fórmico	Acetonitrila	0,3	20	(TANG et al., 2012)
	20	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	40	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,45	12	(FREITAS et al., 2014)
	10	C18 (100 x 3 mm, 3,5 µm)	30	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila 0,1 % ácido fórmico	0,4	25	(MONTEIRO et al., 2015)
	10	(100 x 2,1 mm, 1,9 µm)	30	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila 0,1 % ácido fórmico	0,3	15	(REINHOLDS et al., 2016)
	20	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	40	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,45	12	(SANTOS et al., 2016)
	10	C18	-	Água 0,1 % ácido fórmico, 0,1% formiato de amônio	Metanol:Acetonitrila	0,15	33	(DONE & HALDEN, 2015)
	10	C18 (XDB) (150 x 4,6 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,1% ácido heptafluorobutirico	Acetonitrila	0,6	15	(GUIDI et al., 2017)
	1	C18 (20 x 3 mm, 5 µm)	-	Água 0,2 % ácido fórmico	Acetonitrila 0,2 % ácido fórmico	0,5	13	(ZHANG et al., 2010)

Analitos	Volume de injeção (µL)	Coluna	Temperatura (ºC)	Fase móvel aquosa	Fase móvel orgânica	Vazão (mL min^{-1})	Tempo (min)	Referência
Quinolonas	20	C18 (50 x 2 mm, 2,5 µm)	-	Água 0,2% Ácido fórmico 0,1 mM ácido oxálico	Acetonitrila 0,2% Ácido fórmico 0,1 mM ácido oxálico	0,3	7,2	(YIPEL et al., 2016)
	5	C18 (BEH) (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	-	Água pH 2,5	Metanol pH 2,5	0,3	9	(AUFARTOVÁ et al., 2017)
Sulfonamidas	10	C18 (150 x 2,1 mm, 2,6 µm)	25	Água (5% Acetonitrila) 0,3% ácido fórmico	Acetonitrila (5% Água) 0,3% ácido fórmico	0,4-0,8	14	(KAUFMANN et al., 2011)
	-	C18 (50 x 4,6 mm, 3 µm)	39	Água 0,025% ácido heptafluorobutirico	Acetonitrila	0,25	18	(GBYLIK et al., 2013)
	20	C18 (150 x 2,1 mm, 5 µm)	25	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,3	10	(CHÁFER-PERICÁS et al., 2011)
	10	C18 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,1	21	(DASENAKI & THOMAIDIS, 2010).
	20	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	40	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,45	12	(FREITAS et al., 2014)
	3	C18 (100 x 4,0 mm, 5 µm)	40	Água 0,1 % ácido fórmico	Metanol	0,2	8	(LI et al., 2016)
	10	C18 (100 x 3 mm, 3,5 µm)	30	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila 0,1 % ácido fórmico	0,4	25	(MONTEIRO et al., 2015)
	10	(100 x 2,1 mm, 1,9 µm)	30	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila 0,1 % ácido fórmico	0,3	15	(REINHOLDS et al., 2016)
	20	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	40	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,45	12	(SANTOS et al., 2016)
	5	HSS T3 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,5	6	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	10	C18	-	Água 0,1 % ácido fórmico, 0,1% formiato de amônio	Metanol:Acetonitrila	0,15	33	(DONE & HALDEN, 2015)
	10	C18 (XDB) (150 x 4,6 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,1% ácido heptafluorobutirico	Acetonitrila	0,6	15	(GUIDI et al., 2017)
	20	C18 (50 x 2 mm, 2,5 µm)	-	Água 0,2% Ácido fórmico 0,1 mM ácido oxálico	Acetonitrila 0,2% Ácido fórmico 0,1 mM ácido oxálico	0,3	7,2	(YIPEL et al., 2016)
	20	C18 (Eclipse Plus)) (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	40	Água 10 mM ácido fórmico	Acetonitrila 10 mM ácido fórmico	0,2	10	(JANSOMBOON et al., 2016)
Tetraciclinas	10	C18 (150 x 2,1 mm, 2,6 µm)	25	Água (5% Acetonitrila) 0,3% ácido fórmico	Acetonitrila (5% Água) 0,3% ácido fórmico	0,4-0,8	14	(KAUFMANN et al., 2011)
	-	C18 (50 x 4,6 mm, 3 µm)	40	Água 0,025% ácido heptafluorobutirico	Acetonitrila	0,25	18	(GBYLIK et al., 2013)
	20	C18 (150 x 2,1 mm, 5 µm)	25	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,3	10	(CHÁFER-PERICÁS et al., 2011)
	10	C18 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,1	21	(DASENAKI & THOMAIDIS, 2010).

Analitos	Volume de injeção (µL)	Coluna	Temperatura (ºC)	Fase móvel aquosa	Fase móvel orgânica	Vazão (mL min^{-1})	Tempo (min)	Referência
Tetraciclinas	20	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	40	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,45	12	(FREITAS et al., 2014)
	10	C18 (100 x 3 mm, 3,5 µm)	30	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila 0,1 % ácido fórmico	0,4	25	(MONTEIRO et al., 2015)
	10	(100 x 2,1 mm, 1,9 µm)	30	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila 0,1 % ácido fórmico	0,3	15	(REINHOLDS et al., 2016)
	20	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	40	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,45	12	(SANTOS et al., 2016)
	5	HSS T3 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,1 % ácido fórmico	Acetonitrila	0,5	6	(SERRA-COMPTE et al., 2016)
	50	C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	35	Água 0,1 mM ácido oxálico	Metanol:Acetonitrila	1	18	(LIU et al., 2013)
	10	C18 (XDB) (150 x 4,6 mm, 1,8 µm)	-	Água 0,1% ácido heptafluorobutirico	Acetonitrila	0,6	15	(GUIDI et al., 2017)
	20	C18 (50 x 2 mm, 2,5 µm)	-	Água 0,2% Ácido fórmico 0,1 mM ácido oxálico	Acetonitrila 0,2% Ácido fórmico 0,1 mM ácido oxálico	0,3	7,2	(YIPEL et al., 2016)
	10	C18	-	Água 0,5% Ácido fórmico 0,5 mM ácido oxálico	Metanol:Acetonitrila (1:1) 0,5% Ácido fórmico 0,5 mM ácido oxálico	0,2	30	(DONE & HALDEN, 2015)
	20	C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	35	Água acetato de sódio, cloreto de cálcio, EDTA, pH 7	Metanol:Acetonitrila	1	18	(ORLANDO & SIMIONATO, 2013)
Tranquilizantes	10	C18 (150 x 2,1 mm, 2,6 µm)	25	Água (5% Acetonitrila) 0,3% ácido fórmico	Acetonitrila (5% Água) 0,3% ácido fórmico	0,4-0,8	14	(KAUFMANN et al., 2011)

3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Em guia voltado para a validação e controle de qualidade analítica para fármacos em produtos para aliementação animal e medicamentos veterinários, o MAPA, em 2011, define:

> A validação de determinado procedimento analítico objetiva demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação preconizados. Trata-se de é um estudo experimental e integralmente documentado (MAPA, 2011).

Em 2010, a ANVISA publicou o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Segundo este guia, o objetivo da etapa de validação é a demonstração da apropriação de uma metodologia analítica para uma finalidade pretendida. Em 2017, a União Europeia publicou o guia de controle de qualidade analítica que descreve as exigências para a validação de metodologias analíticas, direcionado para a determinação de resíduos e contaminantes (em especial agrotóxicos) em alimentos (SANTE, 2017). Os objetivos do guia são; a harmonização de sistemas de controle de qualidade; garantir a qualidade e a comparabilidade de resultados; estabelecer uma exatidão aceitável; evitar resultados falso-positivos e falso-negativos; servir de apoio a implementação do sistema ISO/IEC 17025:2005. A definição de validação, neste caso, é a confirmação, através da obtenção de evidências objetivas, que todas as exigências foram cumpridas. No Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), em julho de 2018 publicou um compêndio de orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos (INMETRO, 2018).

Além destes, em agosto de 2002, a comissão das comunidades europeias publicou um documento a respeito da performance analítica de métodos e interpretação de resultados na determinação de resíduos em produtos de origem animal. A validação definida neste documento é semelhante às referências citadas (CD/657/2002).

Alguns dos parâmetros avaliados durante a etapa de validação estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

Parâmetro	Referência	Definição	Aplicação
Seletividade Especificidade	INMETRO ANVISA EU CD/657/02	Distinção de resposta entre analitos, Distinção da resposta do analito na presença de interferentes,	Extração de matriz "branco". Razão entre íons de identificação e quantificação (desvio ± 30%)
Linearidade	INMETRO ANVISA	Correlação entre resposta analítica e concentração	Curva Analítica (y = ax + b)
Faixa Linear de trabalho	INMETRO ANVISA	Intervalo de concentrações em que y e x correlacionam-se linearmente	Curva Analítica (y = ax + b)
Efeito Matriz	Gosetti, 2010	Influência dos componentes da matriz na resposta (y)	Comparação entre curvas preparadas em solvente e em extrato branco
Limite de detecção (LOD)	INMETRO ANVISA	Concentração limite de distinção entre analito e ruído	S/R = 3
Limite de quantificação (LOQ)			S/R = 10
Limite de decisão (CCα)	EU CD/657/02	Limite de concentração passível de decisão/confirmação com propabilidade de erro α/β	CCα = (Ref) + 1,64(Desvio padrão)
Capacidade de detecção (CCβ)			CCβ = CCα + 1,64(Desvio padrão)
Precisão	INMETRO ANVISA	Proximidade de resultados obtidos por diferentes amostragens	Repetibilidade e Reprodutibilidade
Exatidão	INMETRO ANVISA	Proximidade de resultado em relação à uma referência	Ensaios de fortificação

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho proposto consiste na otimização de método visando a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de salmão empregando UHPLC-MS/MS.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

4.1 INSTRUMENTAÇÃO, SOLVENTES E MATERIAIS

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados abaixo:

- Sistema de purificação de água, Milli-Q Direct UV3R (Millipore, EUA);
- Lavadora ultrassônica, linha Soniclean (Sanders do Brasil, Brasil);
- Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- Centrífuga (Centribio, Brasil);
- Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- Ultra-turrax T25 digital (IKA, China);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- Sistema UHPLC-MS/MS, modelo Xevo TQ (Waters, EUA), analisador TQ MS, amostrador automático Sample Manager (Acquity);
- Sistema de aquisição de dados MassLynx V 4.1;
- Sistema gerador de nitrogênio PEAK Scientific (Glasgow, Scotland),

Os reagentes, solventes e demais materiais necessários no desenvolvimento deste trabalho estão listados abaixo:

- Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- Ácido acético glacial 100% (J.T. Baker, EUA);
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3R (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- Metanol, grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);

- Formiato de amônio (Sigma Aldrich, EUA);
- Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS;
- Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker, Japão);
- Sulfato de sódio (Merck, Brasil);
- Cloreto de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- Acetato de sódio anidro (J.T. Baker, EUA);
- Ácido etilenodiamino tetraacético EDTA Sal Dissódico $2H_2O$ P.A. (Synth, Brasil)
- Citrato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- Hidrogenocitrato de sódio sesquiidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- Sorvente Bondesil C18 com d.p. de 40 µm (Agilent, EUA);
- Sorvente Bondesil PSA com d.p. de 40 µm (Agilent, EUA);
- Ácido tricloroacético (TCA) > 99% (Sigma Aldrich, EUA)
- Cartuchos Captiva 3 mL 0,2 µm (Agilent, EUA)
- Sorvente Z-Sep+ (Sigma Aldrich, EUA)
- Cartucho EMR-Lipid 1 mL, 40 mg (Agilent, EUA)
- Acetona grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- Hexano (95% n-hexano) (J.T. Baker, EUA);
- Filtros de PTFE de 13 mm e porosidade de 0,2 µm (Vertical Chromatography, Tailândia);
- Frascos de vidro (vial), capacidade de 2 mL (Agilent, EUA);
- Extran® neutro e alcalino (Merck, Brasil);
- Padrões sólidos dos compostos em estudo com purezas entre 93,5 a 99,8% (Witega e Dr. Erhenstorfer, Alemanha);
- Vidraria comum de laboratório.

4.2 PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

As amostras e amostras “branco” foram recebidas congeladas e armazenadas em embalagens individuais. As amostras foram mantidas sob refrigeração com temperatura menor que - 10 °C. Para a aplicação do método de determinação, o músculo foi separado dos excessos de gordura.

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DOS COMPOSTOS SELECIONADOS

Soluções analíticas do tipo padrão estoque na concentração de 1000 mg L^{-1} foram preparados individualmente para cada composto em estudo, considerando a pureza dos padrões sólidos. A massa do padrão sólido pesado foi dissolvida em acetonitrila e/ou metanol, grau HPLC. A partir das soluções de concentração 1000 mg L^{-1}, preparou-se 10 mL de uma solução de trabalho mistura na concentração 10 mg L^{-1} contendo todos os analitos em estudo. A partir destas, foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 1,0 e 0,1 mg L^{-1} em acetonitrila. Estas soluções foram utilizadas nas fortificações da amostra “branco” de salmão e no preparo dos diferentes níveis de concentração das curvas analíticas.

As soluções de padrão interno (sulfadimetoxina-d6) e padrão de controle (dimetridazol-d3) foram preparadas individualmente na concentração 1000 mg L^{-1}. Em seguida preparou-se 10 mL de solução individual na concentração de 10 mg L^{-1}.

Todas as soluções analíticas foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura menor que -10 °C, sendo que antes de serem utilizadas as soluções foram retiradas do freezer e esperou-se que estas atingissem a temperatura ambiente para utilização.

4.4 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM SALMÃO

4.4.1 Ensaios preliminares

Neste estudo as análises foram realizadas através da utilização do sistema UHPLC-MS/MS, empregando o modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*) e ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization*) nos modos positivo e negativo.

O método inicial para realização dos testes teve a escolha da fase móvel baseada em trabalhos anteriormente publicados para análise de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários (ORSO et al., 2016). A fase móvel empregada consistiu em solução aquosa 2% (v/v) metanol, como fase móvel A e metanol como fase móvel B, ambos contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico e 5 mmol L^{-1}

formiato de amônio. A eluição foi realizada no modo gradiente conforme a Tabela 5. A vazão empregada foi de 225 µL min^{-1} e o volume de injeção foi de 10 µL. A coluna Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm) foi mantida a 40 °C. O tempo total de análise cromatográfica foi de 3 min.

Tabela 5 – Gradiente de eluição da fase móvel utilizado para determinação de resíduos de medicamentos veterinários por UHPLC-MS/MS para fase móvel aquosa (A) e orgânica (B)

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0,00	95	5
0,25	95	5
0,75	0	100
2,30	0	100
2,31	95	5
3,00	95	5

Os ensaios iniciais utilizaram condições da fonte ESI de acordo com trabalhos previamente publicados(KEMMERICH et al., 2015; MARTINS et al., 2016). A voltagem do capilar foi de 2000 V. A temperatura e vazão do gás de dessolvatação (N_2) foi de 500 °C e 600 L h^{-1}, respectivamente. A vazão do gás de nebulização (N_2) foi de 80 L h^{-1}. A vazão do gás de colisão foi de 0,15 mL min^{-1}. A temperatura da fonte de ionização foi de 150 °C.

As condições de monitoramento dos íons precursores e produtos, bem como as energias de colisão e energias do cone foram obtidas através do banco de dados "*Quanpedia*" (Waters, EUA), disponível junto ao software de processamento de dados do equipamento. As transições SRM de quantificação e identificação utilizadas para determinação de cada um dos analitos no sistema UHPLC-MS/MS pode ser observada na Tabela 6.

Tabela 6 - Transições SRM utilizadas na determinação dos resíduos de medicamentos veterinários no sistema UHPLC-MS/MS, massa molar (MM), modo de ionização (ESI +/-), razões massa/carga (m/z) utilizadas para os íos precursor e produtos, energia do cone (V) e energia de colisão (eV).

Compostos	Classe	Massa Molar (g mol^{-1})	Modo de Ionização	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Cone (V)	Colisão (V)
Cloranfenicol	Anfenicóis	323,1	ESI -	321,0	152,1	35	26
					257,1	35	16
Florefenicol		358,2	ESI +	358,1	130,4	24	50
					206,0	24	28
					241,0	24	18
Florfenicol-amina		247,3	ESI +	248,0	130,0	30	20
					230,0	30	20
Tianfenicol		356,2	ESI -	354,0	185,0	35	27
					290,0	35	18
Dilfubenzuron	Benzamidas	310,7	ESI +	328,2	141,0	10	35
					158,3	10	16
Teflubenzuron		381,1	ESI +	380,9	140,9	17	40
					158,0	17	20
Trimetoprim	Diamino-pirimidina	290,3	ESI +	291,0	123,0	35	27
					230,0	35	25
Eritromicina	Macrolídeos	733,9	ESI +	734,4	158,1	29	30
					576,3	29	40
Tilosina		916,1	ESI +	916,5	101,1	57	45
					174,1	57	40
Dimetridazol	Nitro-imidazóis	141,1	ESI +	142,0	81,0	25	22
					96,0	25	15
Metronidazol		171,2	ESI +	172,0	82,0	22	21
					128,0	22	15
Ronidazol		200,2	ESI +	201,0	55,0	17	20
					140,0	17	10
Deltametrina	Piretróides	505,2	ESI +	523,1	281,0	16	18
					506,0	16	11
Ácido Oxolínico	Quinolonas	261,2	ESI +	262,0	216,0	24	30
					244,0	24	19
Danofloxacin		357,4	ESI +	358,2	96,0	32	25
					314,1	32	20
Difloxacin		399,4	ESI +	400,2	299,0	37	27
					356,1	37	21
Enrofloxacin		359,4	ESI +	360,2	245,0	32	20
					316,1	32	22
Sarafloxacin		385,4	ESI +	386,2	299,1	37	27

Compostos	Classe	Massa Molar (g mol^{-1})	Modo de Ionização	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Cone (V)	Colisão (V)
					342,1	37	18
Sulfacloropiridazina	Sulfo-namidas	284,7	ESI +	285,1	92,0	22	28
					156,0	22	15
Sulfadiazina		250,3	ESI +	251,0	92,0	25	27
					156,0	25	15
Sulfadimetoxina-d6		316,4	ESI +	317,1	108,1	30	28
					162,2	30	16
Sulfadoxina		310,3	ESI +	311,0	92,0	27	32
					156,0	27	15
Sulfamerazina		254,3	ESI +	265,0	92,0	26	28
					156,0	26	15
Sulfametazina		278,3	ESI +	279,1	92,0	30	28
					186,0	30	16
Sulfametizol		270,3	ESI +	271,0	92,0	19	30
					156,0	19	15
Sulfametoxazol		253,3	ESI +	254,0	92,0	25	26
					156,0	25	16
Sulfaquinoxalina		300,3	ESI +	301,1	92,2	23	30
					156,1	23	16
Cloretetraciclina	Tetra-ciclinas	478,9	ESI +	479,3	444,2	27	20
					462,2	27	18
Oxitetraciclina		460,4	ESI +	461,2	426,2	22	19
					443,1	22	13
Tetraciclina		444,4	ESI +	445,3	154,0	22	26
					410,2	22	20

4.4.2 Avaliação da fase móvel móvel empregada para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em salmão por UHPLC-MS/MS

De acordo com a Tabela 3 (item 3.4.3), é possivel verificar que existem inúmeras condições de fase móvel empregadas para a determinação das diferentes classes de medicamentos veterinários empregados na aquicultura. Diferentes condições de fase móvel e aditivos foram avaliadas no sistema UHPLC-MS/MS, de modo a obter máxima resposta analítica para os compostos em estudo.

Uma solução padrão preparada em acetonitrila na concentração de 100 µg L^{-1} foi utilizada para avaliação da resposta cromatográfica. O método utilizado para avaliação da fase móvel teve as seguintes condições: eluição realizada no modo

gradiente, conforme a Tabela 6 (item 4.4.1), vazão de 225 µL min^{-1} e volume de injeção de 10 µL. A coluna Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm) foi mantida a 40 °C. O tempo total de análise cromatográfica foi de 3 min.

As fases móveis avaliadas variaram em função da concentração dos aditivos ácido fórmico (entre 0 e 0.2%) e formiato de amônio (entre 0 e 24 mmol L^{-1}), sendo que ambos foram adicionados nas fases orgânica e aquosa. Ainda, foram avaliadas como fase orgânica soluções em metanol, acetonitrila e mistura metanol/acetonitrila 1:1, v/v. Os testes realizados estão apresentados na Tabela 7:

Tabela 7 – Ensaios realizados para avaliação das condições de fase móvel para determinação de resíduos de medicamento veterinário no sistema UHPLC-MS/MS.

Ensaio	Fase Móvel A	Fase Móvel A	Formiato de Amônio (mmol L^{-1})	Ácido Fórmico (%, v/v)
1		Metanol	-	-
2		Metanol/Acetonitrila 1:1 (v/v)	-	-
3		Acetonitrila	-	-
4		Metanol	12	-
5		Metanol/Acetonitrila 1:1 (v/v)	12	-
6		Acetonitrila	12	-
7		Metanol	24	-
8		Metanol/Acetonitrila 1:1 (v/v)	24	-
9		Acetonitrila	24	-
10		Metanol	-	0,1
11		Metanol/Acetonitrila 1:1 (v/v)	-	0,1
12		Acetonitrila	-	0,1
13		Metanol	12	0,1
14	Água ultra pura	Metanol/Acetonitrila 1:1 (v/v)	12	0,1
15		Acetonitrila	12	0,1
16		Metanol	24	0,1
17		Metanol/Acetonitrila 1:1 (v/v)	24	0,1
18		Acetonitrila	24	0,1
19		Metanol	-	0,2
20		Metanol/Acetonitrila 1:1 (v/v)	-	0,2
21		Acetonitrila	-	0,2
22		Metanol	12	0,2
23		Metanol/Acetonitrila 1:1 (v/v)	12	0,2
24		Acetonitrila	12	0,2
25		Metanol	24	0,2
26		Metanol/Acetonitrila 1:1 (v/v)	24	0,2
27		Acetonitrila	24	0,2

4.4.3 Avaliação da coluna cromatográfica e do gradiente de eluição da fase móvel

Após a escolha da fase móvel, de acordo com a intensidade da resposta cromatográfica obtida para cada analito, a resolução dos picos foi avaliada. Uma solução padrão preparada em acetonitrila na concentração de 100 µg L^{-1} foi preparada para avaliação de 5 gradientes de eluição da fase móvel utilizando 3 colunas diferentes. O método utilizado teve como fase móvel aquosa uma solução 12 mmol L^{-1} formiato de amônio e como fase móvel orgânica, metanol 12 mmol L^{-1} formiato de amônio. A vazão empregada foi de 225 µL min^{-1} e o volume de injeção foi de 10 µL. A coluna foi mantida a 60 °C. O tempo total de análise cromatográfica foi de 10 min.

Nesta etapa foram avaliadas três colunas cromatográficas diferentes e cinco gradientes de eluição da fase móvel diferentes. As colunas avaliadas foram Acquity UPLC® HSST3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm), Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm) e Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1, 1,8 µm). Os gradientes de eluição da fase móvel avaliados estão descritos na Tabela 8:

Tabela 8 – Gradientes de eluição da fase móvel utilizados para avaliação da resolução cromatográfica dos compostos em estudo

Gradiente 1			
Tempo (min)	Fase móvel aquosa (%)	Fase móvel orgânica (%)	Curvatura do gradiente
0	95	5	
2	95	5	7
3,1	0	100	7
7	95	5	7
7,1	95	5	7
10	95	5	7

Gradiente 2			
Tempo (min)	Fase móvel aquosa (%)	Fase móvel orgânica (%)	Curvatura do gradiente
0	95	5	
2	95	5	5
3,1	0	100	5
7	95	5	5
7,1	95	5	5
10	95	5	5

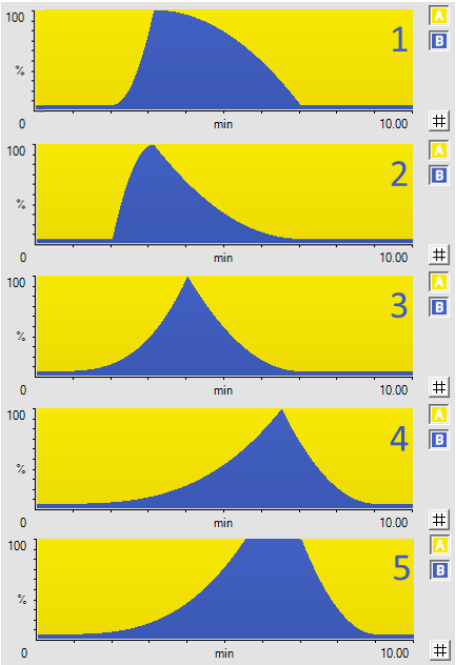
Gradiente 3			
Tempo (min)	Fase móvel aquosa (%)	Fase móvel orgânica (%)	Curvatura do gradiente
0	95	5	
0,5	95	5	8
4	0	100	5
7	95	5	5
7,1	95	5	5
10	95	5	5

Gradiente 4			
Tempo (min)	Fase móvel aquosa (%)	Fase móvel orgânica (%)	Curvatura do gradiente
0	95	5	
0,5	95	5	8
6,5	0	100	8
9	95	5	5
10	95	5	5

Gradiente 5			
Tempo (min)	Fase móvel aquosa (%)	Fase móvel orgânica (%)	Curvatura do gradiente
0	95	5	
0,5	95	5	8
5,5	0	100	8
7	0	100	8
9	95	5	5
10	95	5	5

A visualização da curvatura dos gradientes de eluição da fase móvel orgânica podem ser visualizados na Figura 11.

Figura 11 – Perfil da curvatura dos gradientes de eluição da fase móvel orgânica utilizados para avaliação da resolução cromatográfica dos compostos em estudo.



4.4.4 Otimização das condições da fonte de ionização ESI

Alguns dos parâmetros aplicados na fonte ESI do sistema UHPLC-MS/MS foram avaliados visando um aumento do sinal analítico para os compostos em estudo. Entre os parâmetros avaliados estão a temperatura do gás de dessolvatação, a tensão aplicada no capilar e a vazão utilizada na fase móvel.

Para avaliar estes parâmetros aplicou-se um planejamento de experimentos completo 3^3. Os níveis avaliados foram temperaturas de dessolvatação de 200, 400 e 600 °C, tensões do capilar de 2000, 2400 e 2800 V e vazões de fase móvel de 100, 225 e 400 µL min^{-1}.

Uma solução padrão preparada em acetonitrila na concentração de 100 µg L^{-1} foi utilizada durante esta etapa. O método utilizado empregou fase móvel aquosa solução 12 mmol L^{-1} formiato de amônio e como fase móvel orgânica, metanol 12 mmol L^{-1} formiato de amônio. O gradiente de eluição 1 (de acordo com a Tabela 8, item 4.4.3) foi aplicado para eluição da fase móvel. O volume de injeção foi de 10 µL. A coluna foi mantida a 60 °C. O tempo total de análise cromatográfica foi de 10 min. Nesta etapa utilizou-se a coluna cromatográfica Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1; 1,8 µm).

Os ensaios realizados podem ser visualizados na Tabela 9.

Tabela 9 – Ensaios realizados para otimização das condições da fonte de ionização ESI variando as condições de tensão do capilar, temperatura do gás de dessolvatação e vazão da fase móvel.

	Vazão da fase móvel (µL min^{-1})	Tensão do capilar (V)	Temperatura do gás de dessolvatação (°C)
1	100	2000	200
2	100	2000	400
3	100	2000	600
4	100	2400	200
5	100	2400	400
6	100	2400	600
7	100	2800	200
8	100	2800	400
9	100	2800	600
10	225	2000	200
11	225	2000	400
12	225	2000	600
13	225	2400	200
14	225	2400	400
15	225	2400	600
16	225	2800	200
17	225	2800	400
18	225	2800	600
19	400	2000	200
20	400	2000	400
21	400	2000	600
22	400	2400	200
23	400	2400	400
24	400	2400	600
25	400	2800	200
26	400	2800	400
27	400	2800	600

4.4.5 Avaliação dos métodos individuais e de método multirresíduo para determinação de medicamentos veterinários em salmão

Após as etapas de avaliação da composição da fase móvel, coluna de separação, gradiente de eluição da fase móvel e condições da fonte de ionização foram escolhidas as melhores condições para análise cromatográfica de cada um dos compostos em estudo, baseado na intensidade de sinal obtida. As condições escolhidas podem ser visualizadas na Tabela 10.

Preparou-se soluções de trabalho em acetonitrila nas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 µg L^{-1} (n=3 para os níveis de 1, 10 e 100 µg L^{-1}) para verificação dos métodos escolhidos para análise cromatográfica. As condições avaliadas estão presentes na Tabela 10. Apesar de as condições aplicadas serem específicas para determinados analitos, a aquisição de dados (transições SRM) foi realizada utilizando o método multirresíduo. Assim foi possível avaliar resultados de recuperação (%), desvio padrão relativo (%), relação sinal/ruído e limite de quantificação (µg L^{-1}) para cada analito em cada um dos métodos.

O método multirresíduo foi definido baseado nas condições experimentais que possibilitaram um maior número de compostos com valores de LOQ instrumental menores do que o LMR estabelecido como referência.

Tabela 10 – Métodos cromatográficos utilizados para determinação por UHPLC-MS/MS para cada um dos compostos em estudo.

Compostos	Fase Móvel orgânica	Formiato de Amônio (mmol L^{-1})	Ácido Fórmico (%, v/v)	Coluna cromatográfica	Gradiente de fase móvel	Vazão da fase móvel (µL min^{-1})	Tensão do Capilar (V)	Temperatura do gás de dessolvatação (ºC)	Método
Ronidazol Sulfametazina Florfenicol Eritromicina Trimetoprim	Metanol	12	-	Acquity UPLC® HSS T3 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	2	100	2000	600	1
Sulfamerazina	Metanol	12	-	Acquity UPLC® HSS T3 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	1	100	2000	600	2
Sulfametoxazol Sulfametizol Sulfaquinoxalina	Acetonitrila	-	0,1	Acquity UPLC® HSS T3 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	2	100	2000	600	3
Sulfacloropiridazina	Acetonitrila	-	0,1%	Acquity UPLC® HSS T3 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	1	100	2000	600	4
Ácido Oxolínico	Metanol	-	0,1	Acquity UPLC® HSS T3 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	2	100	2000	600	5
Dimetridazol	Metanol	-	0,1	Acquity UPLC® HSS T3 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	2	100	2800	600	6
Tianfenicol	Metanol	-	0,1	Acquity UPLC® HSS	1	100	2000	600	7

Compostos	Fase Móvel orgânica	Formiato de Amônio (mmol L^{-1})	Ácido Fórmico (%, v/v)	Coluna cromatográfica	Gradiente de fase móvel	Vazão da fase móvel (µL min^{-1})	Tensão do Capilar (V)	Temperatura do gás de dessolvatação (ºC)	Método
				T3 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm					
Enrofloxacin	Metanol/Acetonitrila (1:1, v/v)	12	-	Acquity UPLC® HSS T3 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	3	100	2000	600	8
Metronidazol	Metanol	24	-	Acquity UPLC® HSS T3 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	2	100	2000	600	9
Sulfadoxina	Metanol	12	0,2	Acquity UPLC® HSS T3 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	2	100	2000	600	10
Sulfadiazina	Metanol	24	0,2	Acquity UPLC® HSS T3 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	2	100	2000	600	11
Clortetraciclina Tetraciclina	Acetonitrila	-	0,1	Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2,1 mm) 1,7 µm	2	225	2000	600	12
Oxitetraciclina	Metanol	-	0,1	Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2,1 mm) 1,7 µm	2	225	2000	600	13
Deltametrina	Metanol	12	-	Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2,1 mm) 1,7 µm	1	225	2000	600	14
Teflubenzuron	Metanol	12	-	Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	2	100	2000	600	15
Difloxacin	Metanol/Acetonitrila (1:1, v/v)	12	-	Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	2	100	2000	600	16

Compostos	Fase Móvel orgânica	Formiato de Amônio (mmol L^{-1})	Ácido Fórmico (%, v/v)	Coluna cromatográfica	Gradiente de fase móvel	Vazão da fase móvel (µL min^{-1})	Tensão do Capilar (V)	Temperatura do gás de dessolvatação (ºC)	Método
Diflubenzuron	Metanol	24	-	Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	2	100	2000	400	17
Sarafloxacin	Metanol/Acetonitrila (1:1, v/v)	24	-	Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	2	100	2000	600	18
Tilosina	Acetonitrila	-	0,1	Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	2	100	2000	600	19
Danofloxacin	Metanol/Acetonitrila (1:1, v/v)	12	0,1	Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	2	225	2000	600	20
Cloranfenicol	Metanol/Acetonitrila (1:1, v/v)	-	0,2	Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	1	100	2000	600	21
Florfenicol (amina)	Metanol	-	0,2	Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm	1	100	2000	600	22

4.4.6 Método para determinação multirresíduo de medicamentos veterinários por UHPLC-MS/MS em salmão

O método cromatográfico utilizado para determinação multi-classe de resíduos de medicamentos veterinários foi desenvolvido com base nos resultados dos experimentos anteriores (itens 3.4.2, 3.4.3, 3.4.4 e 3.4.5).

As análises cromatográficas foram realizadas através de sistema UHPLC-MS/MS, empregando o modo de SRM e ESI nos modos positivo e negativo. A fase móvel empregada consistiu em solução aquosa 0,1% ácido fórmico, como fase móvel A e metanol 0,1% (v/v) ácido fórmico, como fase móvel B. A eluição foi realizada no modo gradiente conforme a Tabela 8 e Figura 11 (Gradiente de eluição 1). A coluna empregada foi uma Acquity UPLC® HSS T3 (100 x 2,1 mm) 1,8 µm. A vazão empregada foi de 100 µL min^{-1} e o volume de injeção foi de 10 µL. A coluna foi mantida a 60 °C. O tempo total de análise cromatográfica foi de 10 min. A tensão do capilar foi mantida em 2000 V e a temperatura do gás de dessolvatação escolhida foi de 600 °C. As transições SRM utilizadas na determinação dos resíduos de medicamentos veterinários no sistema UHPLC-MS/MS, modo de ionização (ESI +/-), razões massa/carga (m/z) utilizadas para os íos precursor e produtos, energia do cone (V) e energia de colisão (eV) foram aplicados de acordo com a Tabela 6 (item 4.4.1).

4.5 PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS MULTIRRESÍDUO

Avaliando-se as condições necessárias para extração de cada classe de medicamento veterinário, segundo a Tabela 2 (item 2.4.2), alguns testes preliminares foram realizados. Inicialmente, a proposta foi estabelecer um método simples e rápido para ser aplicado em laboratório de rotina. O método QuEChERS foi avaliado para estudos iniciais devido a sua aplicabilidade na extração de resíduos de agrotóxicos (MAY et al., 2017) e medicamentos vetererinários (BANDEIRA et al., 2017).

4.5.1 Método QuEChERS (versões original, acetato e citrato)

O método QuEChERS (acrônimo das palavras rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, do inglês, *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) foi avaliado seguindo o método original (A) (ANASTASSIADES et al., 2003). Além deste, foram avaliados os métodos oficiais da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (acetato, B) (LEHOTAY, 2007) e da União Europeia (citrato, C) (CEN/TC 275, 2008). Foram realizados experimentos de fortificação da amostra "branco" de salmão no nível 100 µg kg^{-1} e extrações de amostras "branco" para obtenção de extrato e posterior preparo de solução padrão 20 µg L^{-1} em extrato branco da matriz para avaliação da eficiência de extração. Estes três métodos estão descritos a seguir:

As amostras de salmão (*Salmo salar*) foram pesadas (de acordo com a Tabela 11) em tubos de centrífuga de 50 mL e a elas foi adicionado o solvente de extração (de acordo com a Tabela 11). A etapa de homogeneização foi realizada manualmente por 1 min. Seguiu-se para a etapa de partição pela adição dos sais (de acordo com a Tabela 11). As amostras foram agitadas manualmente por 1 min e levadas a centrifugação por 8 min a 10 °C a 2137 × g. Para a etapa de limpeza, realizada com a técnica d-SPE, 2 mL do sobrenadante foram adicionados em um tubo de centrífuga de 15 mL contendo 400 mg de C18 e 200 mg de PSA. As amostras foram agitadas em vortex por 1 min e levadas a centrifugação por 8 min a 2137 × g. O sobrenante obtido foi filtrado com filtros de seringa de PTFE de 13 mm e porosidade de 0,20 µm, diluídos na proporção 1:4 (v,v) em água ultra-pura e injetados no sistema UHPLC-MS/MS.

Tabela 11 – Variações de quantidade de amostra, solvente de extração e sais de partição utilizadas no método QuEChERS

	Original A (ANASTASSIADES et al., 2003)	Acetato B (LEHOTAY, 2007)	Citrato C (CEN/TC 275, 2008)
Quantidade de amostra	10 g	15 g	10 g
Solvente de extração	acetonitrila	acetonitrila 1% ácido acético (v/v)	acetonitrila
Sais de partição	1 g de cloreto de sódio 4 g de sulfato de magnésio	1,5 g de acetato de sódio 6 g de sulfato de magnésio	1 g de cloreto de sódio 1 g de citrato de sódio (2.h_2o) 0,5 g de citrato de sódio (6.h_2o) 4 g de sulfato de magnésio

4.5.2 Método QuEChERS modificado para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em salmão

Para avaliação do método QuEChERS modificado, foi realizado experimento de fortificação em amostra “branco” de salmão no nível 100 µg kg^{-1} e extrações de amostras “branco” na concentração final (5 µg L^{-1}) para avaliação da eficiência de extração. As soluções de extração avaliadas foram acetonitrila (D) e acetonitrila contendo 5% (v/v) ácido acético (E). Os sais de partição avaliados foram 2 g de cloreto de sódio (D) e acetato de sódio (E).

Pesou-se 1 g de amostra de salmão (*Salmo salar*) em tubo de centrífuga de 50 mL e adicionaram-se 8 mL de solvente extrator (D e E) e 2 mL de solução aquosa de EDTA 0,1 mol L^{-1}. As amostras foram homogeneizadas por 20 s em ultra-turrax à 10 000 rpm. Posteriormente, foram adicionados os sais de partição (D e E) e 4 g de sulfato de sódio. As amostras foram agitadas manualmente por 1 min e centrifugadas a 2137 × g por 8 min a 10 °C. Para a etapa de limpeza, 2 mL de extrato foram filtrados em filtro de cartucho Captiva, 0,2 µm x 3 mL de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês *polivinidene fluoride*). Os extratos foram diluídos na proporção 2:3 em água ultrapura e novamente filtrados com filtros de seringa (PTFE, 13 mm e porosidade de 0,20 µm) por duas vezes e injetados no sistema UHPLC-MS/MS.

4.5.3 Avaliação da etapa de extração sólido-líquido

A etapa de extração foi primeiramente otimizada quanto às concentrações de ácido tricloroacético (%) em acetonitrila e de EDTA (mol L^{-1}) em solução aquosa. Para isso foi realizado um planejamento de experimentos do tipo 3^2, onde duas variáveis foram avaliadas em três níveis (-1, 0 e +1). Os níveis correspondentes às concentrações de ácido tricloroacético e EDTA são 1%; 5%; e 10% (v/v) e 0,01; 0,05; e 0,1 mol L^{-1}, respectivamente, conforme a Tabela 12. Realizaram-se um total de 9 experimentos em triplicata resultando em um total de 27 experimentos. Ainda, para cada uma das condições foi realizada uma extração da matriz “branco” para avaliação

da presença dos analitos e preparo de solução padrão no extrato nda matriz na concentração de 20 µg L^{-1} para verificação da recuperação.

Tabela 12 – Experimentos realizados através do planejamento 3^2, para otimização das concentrações de ácido tricloroacético e EDTA utilizados na etapa de extração

Experimento	Concentração de TCA (%)	Concentração de EDTA (mol L^{-1})
1	1	0,01
2	1	0,05
3	1	0,10
4	5	0,01
5	5	0,05
6	5	0,10
7	10	0,01
8	10	0,05
9	10	0,10

Para fins de otimização da etapa de extração foram realizadas fortificações em amostra “branco” de salmão no nível de 500 µg kg^{-1} referentes a concentração final de 20 µg L^{-1}. Ainda, foram preparadas soluções em extrato branco da matriz na concentração 20 µg L^{-1} para avaliação da eficiência de extração.

Os ensaios foram realizados utilizando 1 g de amostra de salmão (*Salmo salar*) em tubo de centrífuga de 50 mL, 8 mL de solvente extrator e 2 mL de solução aquosa de EDTA, conforme a Tabela 12.

As amostras foram homogeneizadas por 20 s em ultra-turrax à 10 000 rpm. Após, as amostras foram centrifugadas a 2137 × g por 8 min a 10 °C. Para a etapa de limpeza, 4 mL de extrato foram filtrados em cartucho Captiva®, 0,2 µm x 3 mL de (PVDF). Os extratos foram diluídos na proporção 2:3 em água ultrapura e filtrados com filtros de seringa (PTFE, 13 mm e porosidade de 0,20 µm) por duas vezes e injetados no sistema UHPLC-MS/MS.

O tratamento de dados foi realizado através da análise da variância (ANOVA, do inglês, *Analysis of Variance*) a 95% de confiança, diagramas de pareto e diagramas de médias marginais.

4.5.4 Avaliação da presença de aditivos no solvente de extração

O ensaio utilizando as melhores condições em termos das concentrações de TCA (%) e de EDTA (mol L^{-1}) foi comparado, em função da intensidade do sinal analítico, com o mesmo método, porém, sem a presença de qualquer tipo de aditivos nos solventes de extração.

Os ensaios foram realizados utilizando 1 g de amostra de salmão (*Salmo salar*) em tubo de centrífuga de 50 mL. Duas combinações de solventes foram utilizadas:

(a) 8 mL de acetonitrila 0,1% (v/v) TCA e 2 mL de solução aquosa de EDTA 0,01 mol L^{-1};

(b) 8 mL de acetonitrila e 2 mL de água ultra pura.

As amostras foram homogeneizadas por 20 s em ultra-turrax à 10 000 rpm. Após, foram centrifugadas a 2137 × g por 8 min a 10 °C. Para a etapa de limpeza, 4 mL de extrato foram filtrados em filtro de cartucho Captiva®, 0,2 µm x 3 mL (PVDF). Os extratos foram diluídos na proporção 2:3 em água ultrapura e filtrados com filtros de seringa (PTFE, 13 mm e porosidade de 0,20 µm) por duas vezes e injetados no sistema UHPLC-MS/MS.

4.5.5 Avaliação da composição do solvente de extração

Para avaliação da utilização de água como solvente de extração, a mistura acetonitrila:água 80:20 (v/v) foi comparada com métodos que utilizam somente água ou somente acetonitrila.

Os ensaios foram realizados utilizando 1 g de amostra de salmão (*Salmo salar*) em tubo de centrífuga de 50 mL. Três solventes de extração foram utilizados:

(a) 8 mL de acetonitrila e 2 mL de água ultra pura;

(b) 10 mL de acetonitrila;

(c) 10 mL de água ultra-pura.

As amostras foram homogeneizadas por 20 s em ultra-turrax à 10 000 rpm. Após, foram centrifugadas a 2137 × g por 8 min a 10 °C. Para a etapa de limpeza, 4 mL de extrato foram filtrados em filtro de cartucho Captiva®, 0,2 µm x 3 mL (PVDF). Os extratos foram diluídos na proporção 2:3 em água ultrapura e filtrados com filtros de seringa (PTFE, 13 mm e porosidade de 0,2 µm) por duas vezes e injetados no sistema UHPLC-MS/MS.

4.5.6 Avaliação da etapa de limpeza e da necessidade de etapa de concentração dos extratos

Para avaliação da etapa de limpeza do extrato utilizou-se um método para determinação de fosfolipídeos por UHPLC-MS/MS (SHIMADZU, 2019). A fase móvel utilizada foi A: solução aquosa contendo 10 m mol L^{-1} formiato de amonio, 0,1% (v/v) ácido fórmico e 2% (v/v) metanol; e fase orgânica (B): metanol contendo 10 m mol L^{-1} formiato de amônio e 0,1% (v/v) ácido fórmico. A coluna utilizada foi Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 um).

Neste método empregou-se método de ionização por ESI utilizando o modo SRM sendo utilizandas os íons precursores de razões massa carga 496, 520, 522, 524, 704, 758, 760, 784, 786, 806, 808 e formação do íon produto característico de razão massa/carga 184.

A etapa de extração foi realizada utilizando 5 g salmão (*Salmo Salar*) em tubo de centrífuga de 50 mL. Foram adicionados 5 mL de acetonitrila como solvente de extração. A homogeneização foi realizada em Ultraturrax por 20 s à 10 000 rpm. Após, as amostras foram centrifugadas durante 8 min a 2137 × g e 10 °C. O sobrenadante obtido foi diluído em água na proporção de 2:3 (2 mL de extrato e 3 mL de água). Os extratos foram submetidos a 5 procedimentos de limpeza diferentes:

1) C18 d-SPE (125 mg/ 1 mL)
2) Z-Sep+® d-SPE (125 mg/ 1 mL)
3) EMR® d-SPE (125 mg/ 1 mL)
4) Captiva® SPE (0.2 um/ 1 mL)
5) EMR® SPE (40 mg/ 1 mL)

4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM SALMÃO

O método foi validado de acordo com a norma 2002/657/EC e SANTE, 2017.

4.6.1 Seletividade

A seletividade foi comprovada pela sobreposição de cromatogramas SRM para os ensaios de recuperações à amostras branco, além da verificação da razão entre os íons de quantificação e identificação.

4.6.2 Curva analítica, efeitos de matriz e faixa linear de trabalho

Foram preparadas curvas de calibração em solvente, em extrato “branco” da matriz e em matriz “branco” nas concentrações de 2,5; 5,0; 12,5; 25,0; 50,0 e 125,0 µg kg^{-1}. Através dos resultados foram obtidos o intervalo linear de trabalho para cada analito em estudo. Foram avaliados os efeitos de matriz para cada um dos analitos, através da relação entre as inclinações das curvas praparadas em solvente e em extrato “branco” da matriz, de acordo com a Equação 1 (SANTE, 2017).

Equação 1 – Efeito de matriz

$$\frac{(\alpha CTM - \alpha CTS)x\ 100\%}{\alpha CTS} = Efeito\ de\ Matriz$$

Sendo:

- αCTM = inclinação da reta obtida através da curva de trabalho preparada no extrato “branco” da matriz.

- αCTS = inclinação da reta obtida através da curva de trabalho preparada no solvente (acetonitrila).

4.6.3 Limite de decisão (CCα), capacidade de detecção (CCβ), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O CCα e o LOQ foram estabelecidos de acordo com os ensaios de fortificação. A menor concentração avaliada que apresentou resultados de recuperação adequados (70 a 120%), desvio aceitável (<20%), desvio da razão entre íons entre ± 30% à media das razões utilizada para calibração e razão sinal/ruído maior do que 10 foi considerada o LOQ e CCα. O LOD foi estimado dividindo-se a concentração obtida para LOQ por 3,33. O CCβ foi obtido segundo a equação 2 (CD/657/2002):

Equação 2 – Capacidade de detecção

$$CC\beta = [LOQ\ ou\ CC\alpha]\ +\ 1{,}64(SD_{[LOQ\ ou\ CC\alpha]})$$

Sendo:

- [LOQ ou CCα] = A menor concentração, dos ensaios de fortificação, que apresentou resultados aceitáveis.

- $SD_{[LOQ\ ou\ CC\alpha]}$ = Desvio padrão das concentrações calculadas (n=5), através da cruva de calibração, para o ensaio de fortificação na menor concentração que apresentou resultados aceitáveis.

4.6.4 Exatidão, precisão e precisão intermediária

Para cada concentração referente aos pontos da curva utilizada para calibração foram realizadas seis réplicas de ensaios de fortificação em dois dias diferentes para verificação da precisão, precisão intermediária e exatidão do método. A exatidão, precisão e precisão intermediária foi calculada através dos resultados de recuperação e RSD. As recuperações, para ensaios de exatidação, precisão e precisão intermediária, foram calculadas de acordo com a Equação 3 (CD/657/2002):

Equação 3 – Recuperação

$$\frac{[medida]\ x\ 100\%}{[fortificada]} = Recuperação$$

Sendo:

- $[\mathrm{medida}]$ = concentração calculada para o ensaio de fortificação através de equação da reta da curva de calibração em µg kg^{-1}.

- $[\mathrm{fortificada}]$ = concentração adicionada na amostra “branco” para o ensaio de fortificação em µg kg^{-1}.

4.6.5 Aplicação do método em amostras reais

O método validado foi aplicado para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em 15 amostras de salmão por UHPLC-MS/MS. As amostras foram adquiridas comercialmente, sendo 13 amostras da espécie *Salmo salar* (salmão do atlântico), uma amostra da espécie *Oncorhynchus keta* (salmão cão) e uma amostra da espécie *Oncorhynchus gorbuscha* (salmão rosado). As amostras foram submetidas a processamento onde o músuclo foi separado para análise. Cerca

de 500 g de salmão foi recolhido para cada amostras. As amostras permaneceram congeladas até a data do preparo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS MULTIRRESÍDUO

5.1.1 Ensaios preliminares

A injeção de uma curva analítica preparada em acetonitrila nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10, 20 e 50 µg L^{-1} permitiu a avaliação das transições (quantificação e identificação) no modo SRM utilizando modo de ionização ESI positivo ou negativo utilizando espectrometria de massas em série. A fonte de ionização ESI é indicada para compostos de polaridade moderada, sendo capaz de promover a formação de íons pseudo-moleculares pela perda ou ganho de íons H^+, dependendo das condições de pH do meio (MANISALI et al., 2006).

A curva analítica foi avaliada em termos de formato de pico cromatográfico, razão sinal/ruído e coeficiente de determinação (r^2). Os resultados de concentração mínima (razão sinal/ruído ≥10, considerada o LOQ) e dos coeficientes de determinação (r^2) são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Analitos avaliados durante o desenvolvimento do método de separação e determinação por UHPLC-MS/MS em termos de limite de quantificação (LOQ) e coeficiente de determinação (r^2)

Analitos	Coeficiente de determinação (r^2)	LOQ (µg L^{-1})
Emamectina	0,99603	0,5
Enrofloxacin	0,99684	0,5
Eritromicina	0,99842	0,5
Metronidazol	0,99894	0,5
Ronidazol	0,99899	0,2
Sulfametizol	0,99939	1,0
Sulfamerazina	0,99952	0,5
Sulfacloropiridazina	0,99968	1,0
Sulfadiazina	0,99971	0,5
Sulfametoxazol	0,99972	0,5
Tilosina	0,99991	0,5
Sulfadoxina	0,99994	0,1
Trimetoprim	0,99997	0,1
Ácido Oxolínico	0,99998	0,1

Analitos	Coeficiente de determinação (r^2)	LOQ (µg L^{-1})
Sulfaquinoxalina	0,99998	0,2
Dimetridazol	0,99999	2,0
Difloxacin	-	20,0
Sarafloxacin	-	20,0
Tetraciclina	-	20,0
Florfenicol	-	20,0
Florfenicol-amina	-	20,0
Clortetraciclina	-	50,0
Teflubenzuron	-	50,0
Oxitetraciclina	-	50,0
Danofloxacin	-	50,0
Deltametrina	-	50,0
Cloranfenicol	-	50,0

Observa-se, na Tabela 13, que 16 compostos avaliados apresentaram resultados aceitáveis de coeficiente de determinação (r^2) ≥ 0,99. Além disso, apresentaram valores de LOQ que variaram entre 0,5 e 2,0 µg L^{-1}. Por outro lado, 40,7% (11) dos analitos de interesse (difloxacin, sarafloxacin, tetraciclina, florfenicol, florfenicol-amina, clortetraciclina, teflubenzuron, oxitetraciclina, danofloxacin, deltametrina e cloranfenicol) não apresentaram valores aceitáveis de r^2. Estes compostos apresentaram um baixo sinal analítico na faixa de concentração avaliada. Para estes compostos os valores de LOQ ficaram entre 20 e 50 µg L^{-1}. Neste ensaio a maioria dos compostos foram eluídos sobrepostos, apresentando baixa resolução cromatográfica. Apenas os compostos teflubenzuron e deltametrina foram eluídos em tempos de retenção maiores e não apresentaram sobreposição de picos cromatográficos. Entretanto, não há perda de detectabilidade ou seletividade uma vez que os dados referentes aos analitos são adquiridos em tempos distintos, obtendo um número aceitável de pontos (> 10) por pico cromatográfico. Ainda, a identificação de cada um dos analitos é possível graças a transições individuais características (PRESTES et al., 2013).

5.1.2 Escolha da fase móvel empregada para determinação de resíduos de medicamentos veterinários por UHPLC-MS/MS

O estudo da fase móvel é fundamental para o aumento da intensidade do sinal analíticos dos compostos em estudo (XU et al., 2018). A avaliação foi realizada de acordo com as condições de composição de fase móvel apresentadas na Tabela 7 (item 3.4.3). O sinal. Os resultados obtidos (área do pico cromatográfico) para cada analito, em cada uma das condições de análise foram organizados em gráficos de barras ordenados do menor para o maior. Os gráficos obtidos para cada um dos analitos encontram-se disponíveis no apêndice A.

Durante a realização do experimento, muitos ensaios para avaliação da composição da fase móvel foram excluídos devido a problemas de solubilidade do formiato de amônio na fase orgânica(acetonitrila). Foram elas, de acordo com a Tabela 8 (item 4.4.3):

6) Água ultra pura e acetonitrila 12 mmol L^{-1} formiato de amônio;

9) Água ultra pura e acetonitrila 24 mmol L^{-1} formiato de amônio;

15) Água ultra pura e acetonitrila 12 mmol L^{-1} formiato de amônio/ 0,1% (v/v) ácido acético;

17) Água ultra pura e solução acetonitrila/metanol 1:1 (v/v) 24 mmol L^{-1} formiato de amônio/ 0,1% (v/v) ácido fórmico;

18) Água ultra pura e acetonitrila 24 mmol L^{-1} formiato de amônio/ 0,1% (v/v) ácido acético;

23) Água ultra pura e solução acetonitrila/metanol 1:1 (v/v) 12 mmol L^{-1} formiato de amônio/ 0,1% ácido acético;

24) Água ultra pura e acetonitrila 12 mmol L^{-1} formiato de amônio/ 0,2% (v/v) ácido acético;

26) Água ultra pura e solução acetonitrila/metanol 1:1 (v/v) 24 mmol L^{-1} formiato de amônio/ 0,2% (v/v)ácido acético;

27) Água ultra pura e acetonitrila 24 mmol L^{-1} formiato de amônio/ 0,2% (v/v) ácido acético.

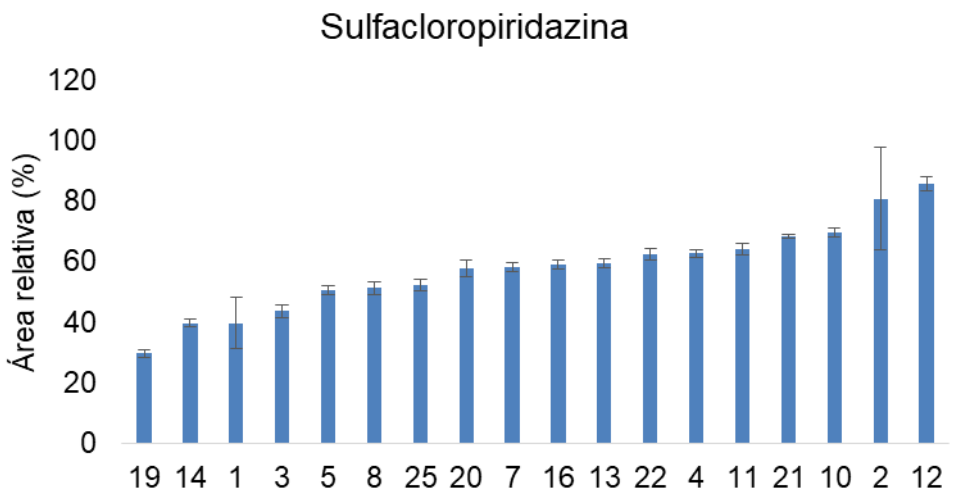
A adição de ácidos na fase móvel pode facilitar a ionização de substâncias quando da formação de íons pseudo-moleculares do tipo $[M + H]^+$. O inverso acontece quando adiciona-se o íon amônio (NH_4^+), a resposta diminuiu quando adicionou-se acetato de amônio a fase móvel (HUANG et al., 2016). O uso de acetato de amônio também pode favorecer a retenção de alguns compostos em cromatografia de fase reversa, como é o caso do composto florefenicol-amina (BARRETO et al., 2016). No caso das tetraciclinas, uma retenção maior na coluna cromatográfica pode significar

um alargamento de pico, afetando diretamente a resolução de picos e o limite de quantificação do método. O uso de fase móvel em pH ácido é indicado para impedir a alta interação das tetraciclinas com os grupos silanóis presentes na fase estacionária (LIU et al., 2013).

A adição de ácidos como aditivos da fase móvel também pode inibir a presença dos resíduos de antibióticos na forma de sal e aumentar a intensidade dos íons pseudo-moleculares (FREITAS et al., 2014). Entretanto, analitos que são submetidos a ionização no modo negativo, por exemplo o cloranfenicol, sofrem supressão de sinal quando utilizam-se ácidos como aditivos de fase móvel (BARRETO et al., 2016).

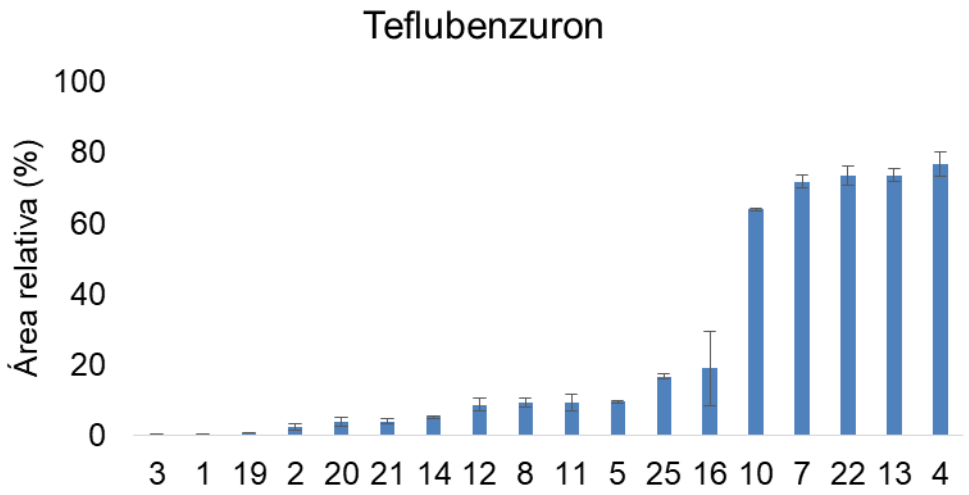
Entretanto, pelos resultados obtidos, é possível perceber que alguns compostos não apresentam nenhuma ou pouca alteração do sinal cromatográfico, quando da alteração da composição da fase móvel, com aditivos ácidos ou básicos. No caso das sulfonamidas, a variação na intensidade de sinal (área relativa à máxima obtida nos ensaios) em função da composição da fase móvel (de acordo com a tabela 8, item 4.4.3), apresentada na Figura 12, foi relativamente baixa, em comparação com outros compostos..

Figura 12 – Área relativa (à maxima obtida no ensaio) em função da composição da fase móvel de acordo com a Tabela 8 (item 4.4.3) para o composto cloropiridazina



As benzamidas, por exemplo, apresentaram uma variação maior de intensidade de sinal (área relativa à máxima obtida nos ensaios) em função da composição da fase móvel (de acordo com a tabela 8, item 4.4.3), apresentada na Figura 13, em função da variação da composição de fase móvel.

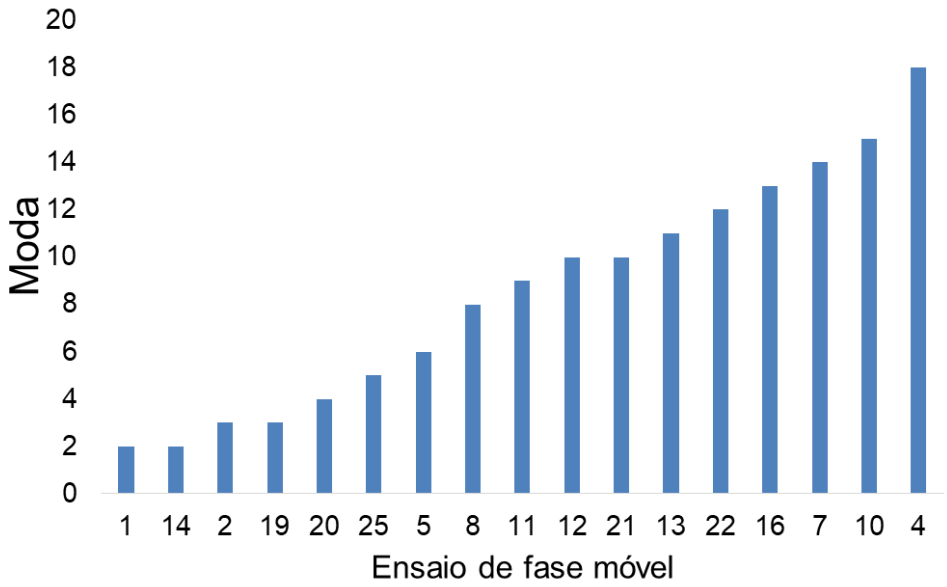
Figura 13 - Área relativa (à maxima obtida no ensaio) em função da composição da fase móvel de acordo com a Tabela 8 (item 4.4.3) para o composto teflubenzuron



Tendo em vista o desenvolvimento de um método para determinação multirresíduo de medicamentos veterinários, a composição de fase móvel mais adequada para cada analito não pode ser aplicada. Por outro lado, a fase móvel a ser definida deve possibilitar a determinação simultânea dos analitos de interesse de forma que seja estabelecido um compromisso entre a composição da fase móvel e o sinal analítico de cada analito, de modo a garantir a obtenção de resultados confiáveis.

Sendo assim, a fase móvel escolhida para a sequência do trabalho foi aquela que apareceu com maior frequência (moda, M_o, valor que mais aparece num conjunto de dados). Ou seja, foi definida em função da composição que possibilitouo maior sinal analítico para cada analito. A Figura 12 apresenta os resultados para moda, entre as fases móveis consideradas as 5 melhores para cada analito.

Figura 14 – Moda dos ensaios de fase móvel presentes entre as 5 melhores para os compostos em estudo (de acordo com a Tabela 8).



A fase móvel composta por água e metanol (12 mmol L^{-1} formiato de amônio) esteve por 18 vezes presente entre as 5 melhores fases móveis para cada analito. Somente para os compostos cloranfenicol, sarafloxacin, tianfenicol, sulfametizol, florfenicol (amina), dimetridazol e a classe das tetraciclinas esta fase móvel não esteve entre as melhores. Portanto, a fase móvel escolhida para o decorrer do trabalho foi água e metanol (12 mmol L^{-1} formiato de amônio).

5.1.3 Escolha da coluna de separação e dos gradientes de eluição da fase móvel

Nesta etapa foram avaliadas três colunas cromatográficas e cinco gradientes de eluição da fase móvel. A temperatura da coluna foi aumentada de 40 para 60 °C. Devido determinação de resíduos em amostras de origem animal co-extrativos, como por exemplo fosfolipídeos, são mais facilmente removidos durante a aplicação do gradiente de fase móvel em temperaturas maiores, devido a solubilidade (GADAJ et al., 2014). Conforme descrito no item 3.4.3 as colunas avaliadas foram Acquity UPLC® HSST3 (100 x 2,1 mm; 1,8 µm), Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 µm) e Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1; 1,8 µm).

A fase estacionária da coluna ACQUITY UPLC® BEH apresenta um resultado superior para separação cromatográfica de bases. Enquanto a coluna ACQUITY UPLC® HSS T3 é projetada para separação de compostos orgânicos polares. Quando

comparadas a coluna ACQUITY UPLC HSS T3 retêm mais fortemente os compostos do que a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 (WATERS, 2019). Por outro lado, a coluna Zorbax Eclipse Plus apresenta um comportamento mais abrangente, sendo indicada para compostos ácido, básicos ou nutros (AGILENT, 2019a).

As colunas e gradientes de eluição da fase móvel foram avaliados observando-se os cromatogramas obtidos em cada uma das condições. Os compostos foram avaliados em termos de repetiblidade de tempo de retenção, simetria e sobreposição de picos.

Esta etapa foi necessária devido a baixa resolução cromatográfica do método. O método além de ser avaliado em termos da composição do gradiente de eluição da fase móvel, também passou a ter 10 min de tempo de análise. Até então os resultados obtidos eram satisfatórios, entretanto, um futuro aumento do escopo do método seria mais facilmente administrado em um tempo total de análise cromatográfica maior. Ainda, com um tempo maior de análise as variações de tempo de retenção diminuíram, em comparação ao método de 3 min, devido ao maior tempo de estabilização das condições de fase móvel aplicado ao final do gradiente de eluição da fase móvel.

Os gradientes de eluição da fase móvel 3, 4 e 5, conforme a Tabela 8 e Figura 11, não demonstraram resultados satisfatórios e por isso não foram considerados na avaliação. Nestes gradientes os picos apresentaram assimetria para a maioria dos compostos em estudo.

Verificou-se que não houveram diferenças significativas na repetibilidade dos tempos de retenção ($p>0,05$) e não houve melhora na resolução dos picos cromatográficos para os gradientes de eluição 1 e 2. Sendo assim, o critério escolhido pra escolha da coluna e do gradiente de eluição foi a simetria dos picos cromatográficos.

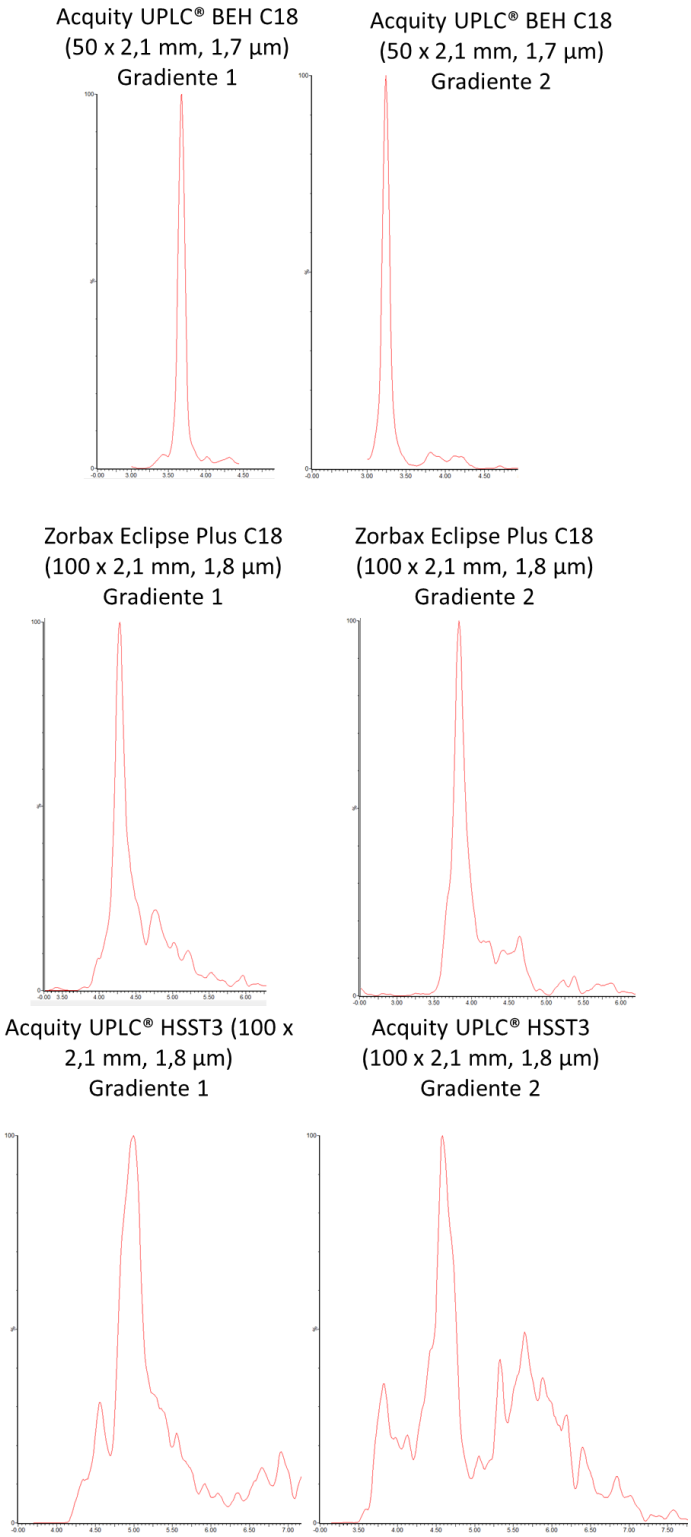
As avaliações foram realizadas estabelecendo valores qualitativos para cada analito em cada uma das condições avaliadas. Uma tabela foi construída atribuíndo os valores:

- 1, para compostos com pouca ou nenhuma assimetria frontal ou caudal;
- 0, para compostos com assimetria considerável;
- -1 para compostos com assimetria frontal e caudal.

A Figura 15 apresenta os resultados para avaliação qualitativa do composto oxitetraciclina nos gradientes 1 e 2 para cada uma das colunas avaliadas. Poe ser

observado os fatores de 1, atribuídos a coluna Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm), o fator 0, atribuído a coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm) e o fator -1 atribuído a coluna Acquity UPLC® HSST3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm).

Figura 15 – Cromaogramas do ion total obtido pelo sistema UHPLC-MS/MS para o composto oxitetraciclina para os gradientes 1 e 2 nas colunas avaliadas.



Os resultados para a análise qualitativa utilizada na escolha da melhor coluna cromatográfica e melhor gradiente de eluição da fase móvel são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Avaliação dos formatos de pico para os compostos em estudo nos gradientes de eluição 1 e 2 em cada uma das coluna cromatográficas avaliadas.

Compostos	Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)		Acquity UPLC® HSST3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)		Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	
	Gradiente 1	Gradiente 2	Gradiente 1	Gradiente 2	Gradiente 1	Gradiente 2
Dimetridazol	1	1	1	1	1	1
Metronidazol	1	1	1	1	1	-1
Ronidazol	1	1	1	1	-1	-1
Florfenicol (amina)	1	1	-1	1	-1	-1
Sulfadiazina	1	1	1	1	-1	-1
Sulfametoxazol	1	1	1	1	1	1
Ácido Oxolínico	1	1	1	1	1	1
Sulfamerazina	1	1	1	1	1	1
Sulfametizol	1	1	1	1	1	-1
Sulfametazina	1	1	1	1	1	1
Sulfacloropiridazina	1	1	1	1	1	1
Trimetoprim	1	1	1	1	1	1
Sulfaquinoxalina	1	1	1	1	-1	-1
Sulfadoxina	1	1	1	1	1	1
Diflubenzuron	1	1	-1	-1	1	1
Florfenicol	1	1	1	1	-1	-1
Danofloxacin	1	1	-1	-1	1	1
Enrofloxacin	1	1	-1	-1	1	1
Teflubenzuron	1	1	1	1	1	1
Sarafloxacin	1	1	1	-1	1	1
Difloxacin	1	1	-1	-1	1	1
Tetraciclina	0	0	-1	-1	1	1
Oxitetraciclina	0	0	-1	-1	1	1
Clortetraciclina	1	1	-1	-1	1	1
Deltametrina	1	-1	1	-1	1	1
Eritromicina	1	1	1	1	0	0
Tilosina	1	1	1	1	1	1
Cloranfenicol	1	1	1	1	1	1
Tianfenicol	1	1	1	1	1	1
∑	27	25	13	11	18	14

O ensaio com o máximo de pontuação foi escolhido. Sendo assim, a coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1; 1,8 µm) e o gradiente de eluição 1 foram escolhidos para os testes posteriores.

5.1.4 Otimização das condições da fonte de ionização ESI

Entre os parâmetros avaliados para a otimização das condições da fonte ESI estão a temperatura do gás de dessolvatação, a tensão aplicada no capilar e a vazão utilizada na fase móvel. Para avaliar estas condições foi aplicado um planejamento de experimentos completo 3^3. Foram avaliados os níveis de 200, 400 e 600 °C para temperatura do gás de dessolvatação, 2000, 2400 e 2800 V para tensão do capilar e 100, 225 e 400 µL min^{-1} para vazão da fase móvel.

Os dados de área cromatográfica dos compostos em estudo foram obtidos através de uma solução padrão preparada em solvente na concentração de 100 µg L^{-1} e colocados como variável dependente para cada ensaio. Os dados foram avaliados pelo software *Statistica*. A avaliação foi realizada utilizando análise da variância (ANOVA) a 95% de confiança, diagramas de médias marginais e diagrama de pareto. O modelo considerou interações lineares e quadráticas. As tabelas de análise da variância para cada um dos compostos em estudo estão presentes no Apêndice C.

Primeiramente, através da ANOVA foi determinado quais compostos apresentaram falta de ajuste ao modelo. Ou seja, a intensidade de sinal (área) deste analito não sofreu alteração devido aos fatores em estudo. Foram eles: ronidazole, trimetoprim, florfenicol e oxitetraciclina. Os outros compostos apresentaram mudança de resposta influenciada por pelo menos um dos fatores em estudo.

Os valores dos efeitos obtidos, em função da área, pelo diagrama de pareto para as três variáveis (lineares e quadráticas) estão na Tabela 15, exceto para tensão do capilar(Q) que não foi significativa para nenhum dos compostos.

Tabela 15 – Efeitos obtidos no diagrama de pareto para cada uma das variáveis lineares e quadráticas, exceto tensão do capilar(Q).

	Vazão (L)	Tensão do capilar (L)	Temperatura dessolvatação (L)	Temperatura dessolvatação (Q)	Vazão (Q)
Cloranfenicol	-48		28	8	-10
Clortetraciclina		8	34	5	33

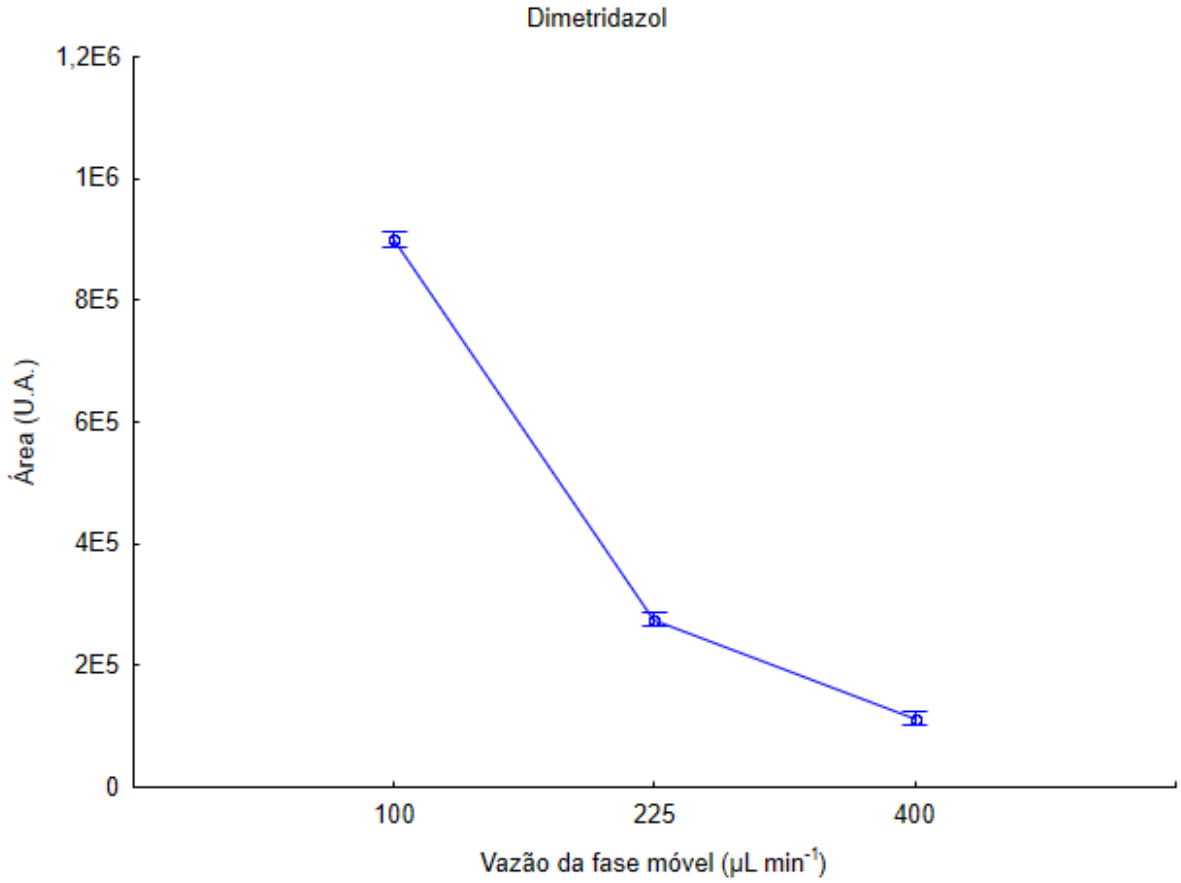
Danofloxacin	-3	-3	16	-4	-9
Deltametrina	-13		13	3	9
Difloxacin	-32		25	10	2
Diflubenzuron	-20		4	-3	3
Dimetridazol	-95		8	4	-41
Enrofloxacin	-19		23	6	4
Eritromicina	-44		34	7	-4
Florfenicol (amina)	-20		8		9
Metronidazol	-33	-3	17		12
Ácido Oxolínico	-24	-2	17	-2	2
Sarafloxacin	-13		24	4	7
Sulfacloropiridazina	-34		14		11
Sulfadiazine	-35	-3	15		7
Sulfadimetoxazol	-40		19	-4	13
Sulfadoxina	-42	-3	21	-2	14
Sulfamerazina	-35		15		11
Sulfametazina	-33	-3	16	-3	12
Sulfametizol	-18		12	-2	3
Sulfaquinoxalina	-42		19	-2	12
Teflubenzuron	-70		17	5	-19
Tetraciclina	3	2	25	3	6
Tianfenicol	-55		21	3	-16
Tilosina	-19		26	5	3

O efeito que teve maior influência na resposta foi a vazão da fase móvel (L). O composto clortetraciclina não foi afetado por este efeito. Por outro lado,tetraciclina apresentou um efeito positivo (3). Isso se deve, principalmente, pela assimetria dos picos cromatográficos das tetraciclinas em vazões abaixo de 225 µL min^{-1}.

Os outros compostos apresentaram um efeito negativo para vazão da fase móvel (L). Para alguns compostos, como por exemplo o dimetridazole (-95), este parâmetro apresentou uma alta influência na intensidade de sinal analítico. Outros compostos, como danofloxacin (-3) tiveram o sinal analítico influenciado negativamente pela vazão da fase móvel.

Conclui-se que para a maioria dos compostos em estudo, quando aplicadas baixas vazões de fase móvel (100 µL min^{-1}), obteve-se sinais analíticos maiores. Isto também pode ser observado nos diagramas de médias marginais para vazão de fase móvel, apresentado na Figura 13 para o composto dimetridazol. Este perfil se repetiu para todos os analitos que tiveram efeito negativo para o efeito vazão da fase móvel (L).

Figura 16 – Diagrama de médias marginais mostrando a influência da vazão da fase móvel na intensidade do sinal analítico (área) para o composto dimetridazol



A temperatura de dessolvatação (L) também influenciou a maioria dos compostos, com exceção apenas daqueles que apresentaram falta de ajuste do modelo. Todos os compostos apresentaram um efeito positivo com o aumento da temperatura de dessolvatação. Para maioria dos compostos, maiores intensidades de sinal analítico (área) foram obtidas quando a temperatura do gás de dessolvatação foi de 600 °C (maior temperatura em estudo). A exceção foi o diflubenzuron que apresentou máxima resposta em 400 °C.

A tensão do capilar (L) influenciou a resposta de apenas 8 compostos. Sendo seis deles de maneira negativa (sulfadiazine, sulfamethazine, fanofloxacin, metronidazole, sulfadoxine e ácido oxolínico) e dois de maneira positiva (tetraciclina e clortetraciclina).

Tendo em vista que a menor vazão de fase móvel (100 µL min^{-1}) e a máxima temperatura de dessolvatação (600 °C) foram responsáveis pelas melhores respostas,

o sistema em estudo deveria ser novamente submetido à avaliação, expandindo os limites estudados. Entretanto, estes parâmetros já estão próximos dos limites instrumentais do sistema UHPLC-MS/MS.

5.1.5 Melhores condições do sistema UHPLC-MS/MS para cada analito e avaliação de método multirresíduo

Após as avaliações da composição da fase móvel, gradiente de eluição, coluna cromatográfica e condições da fonte de ionização o método multirresíduo seria baseado na injeção de 10 µL em coluna do tipo Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1, 1,8 µm) mantida a 60 °C. A fase móvel utilizada seria solução aquosa 12 mmol L^{-1} formiato de amônio e metanol 12 mmol L^{-1} formiato de amônio utilizando o gradiente de eluição 1 (de acordo com a Tabela 8) e tempo total de análise cromatográfica de 10 min com vazão de 100 µL min^{-1}. A tensão do capilar seria de 2000 V e a temperatura de dessolvatação de 600 °C.

Entretanto, após realizados todos estes ensaios, foi possível estabelecer as melhores condições para o sistema UHPLC-MS/MS obtidas para cada um dos analitos. Assim foram avaliados 22 métodos (de acordo com a Tabela 10). Os limites de quantificação obtidos para cada um dos métodos foi comparado ao limite máximo de resíduo exigido. Assim, o método com o maior número de compostos com limite de quantificação abaixo do limite necessário foi escolhido.

Os métodos número 3 e 7 apresentaram resultados de limite de quantificação abaixo do Limite Máximo de Resíduo para 28 compostos. O método 7 foi escolhido por apresentar limites de quantificação menores do que o método 3.

5.1.6 Método para determinação multi-classe de resíduos de medicamentos veterinários utilizando UHPLC-MS/MS

O método cromatográfico para determinação de resíduos de medicamentos veterinários teve como volume de injeção de 10 µL em coluna do tipo Acquity UPLC® HSST3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm) mantida a 60 °C. A fase móvel utilizada foi água e metanol, ambos 0,1% ácido fórmico com vazão de 100 µL min^{-1} utilizando o gradiente de eluição 1 (de acordo com a Tabela 8 do item 4.4.3) e tempo total de análise

cromatográfica de 10 min. A tensão do capilar foi de 2000 V e a temperatura do gás de dessolvatação de 600 °C.

5.2 PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM SALMÃO

5.2.1 Método QuEChERS versões original, acetato e citrato

O preparo de amostras utilizando os métodos QuEChERS original (ANASTASSIADES et al., 2003), acetato (LEHOTAY, 2007) e citrato (CEN/TC 275, 2008) foi avaliado em função da recuperação(%) e RSD(%) dos compostos em estudo. Os resultados podem ser observados na Figura 14.

Não foi possível avaliar os compostos dilfubenzuron, tetraciclina, oxitetraciclina, cloretetraciclina e deltametrina devido ausência de sinal analítco após a realização do ensaio de fortificação. As recuperações obtidas para dimetridazol, ronidazol e metronidazol foram aceitáveis (70 - 120%) para os 3 métodos de extração avaliados. Os compostos tianfenicol e cloranfenicol apresentaram recuperações adequadas, entretanto, para o método QuEChERS original os desvios ficaram além do aceitável (>20%). Ainda, o método QuEChERS acetato mostrou-se efetivo para determinação de resíduos de florefenicol, sulfametoxazol, sulfadoxina, sulfadiazina, sulfamerazina, eritromicina, sulfaquinoxalina e sulfacloropiridazina. Os compostos trimetoprim, ácido oxolínico, teflubenzuron, sulfametizol, emamectina, tilosina, difloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin e danofloxacin não apresentaram resultados aceitáveis de recuperação para nenhum dos 3 métodos avaliados. O composto florfenicol-amina, quando avaliado pelo método QuEChERS acetato, apresentou recuperação adequada. Por outro lado, onão apresentou resultados de RSD% adequados.

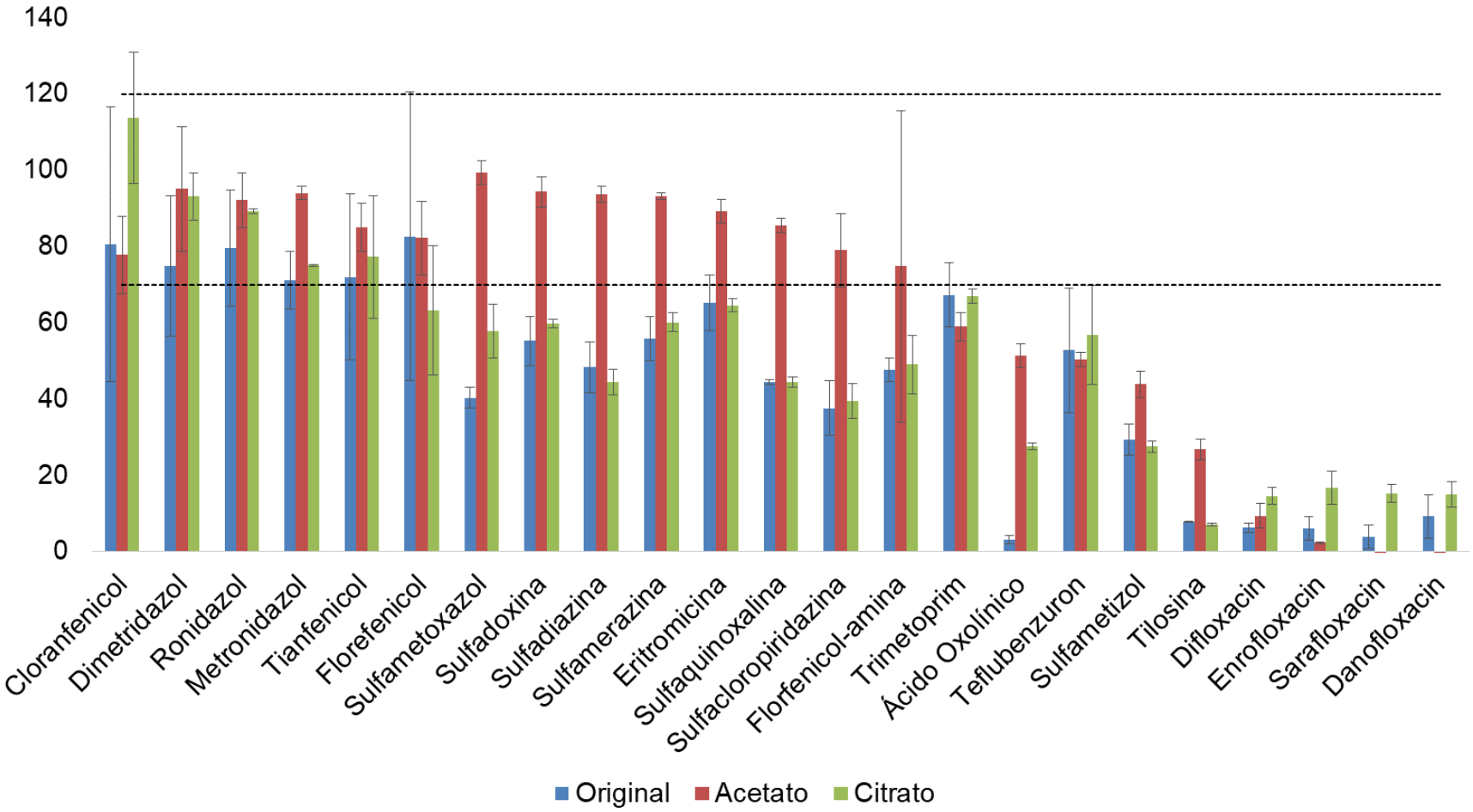
O método QuEChERS original foi introduzido em 2003 tendo como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro para ser aplicado na extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal. Atualmente, vem ganhando espaço também na análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (PRESTES et al., 2013). Diferentes métodos, baseados no método QuEChERS, têm sido aplicados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em peixes. Observa-se a utilização de diferentes misturas de sais na etapa de partição, como por exemplo, cloreto de sódio, sulfato de sódio e

acetato de sódio (ORLANDO & SIMIONATO, 2013). Além destes, cloreto de sódio e acetato de magnésio (GADAJ et al., 2014) e sulfato de magnésio e acetato de sódio (SERRA-COMPTE et al., 2016). Por outro lado, algumas aplicações optam por complementar as etapas de extração e partição pela adição de de soluções tampão (TANG et al., 2012) e agentes complexantes (KAUFMANN et al., 2011). Estas modificações são realizadas visando aumentar as eficiências de extração de alguns medicamentos veterinários sensíveis ao pH de extração, como por exemplo sulfonamidas e trimetoprim e também impedir a formação de complexos, como por exemplo tetraciclinas e quinolonas.

Portanto, decidiu-se adaptar o método QuEChERS buscando aumentar a eficiência de extração para aqueles compostos com baixa ou nenhuma recuperação.

.

Figura 17 – Resultados de recuperação (%) para avaliação da etapa de extração de amostras de salmão utilizando os métodos QuEChERS Original, Acetato e Citrato.



5.2.2 Método QuEChERS adaptado para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em salmão

O método QuEChERS foi adaptado utilizando uma solução aquosa de EDTA 0,1 mol L^{-1} e os solventes de extração foram acetonitrila (D) e acetonitrila 5% (v/v) ácido acético (E) e sais de partição cloreto de sódio (D) e acetato de sódio (E), foram aplicados visando um aumento da eficiência de extração dos métodos QuEChERS Original, Acetato e Citrato.

Os resultados foram avaliados em função da recuperação obtida para os métodos D e E. As recuperações(5) podem ser observadas na Figura 15.

Os resultados apresentados na Figura 15 demonstram que para os compostos enrofloxacin, ácido oxolínico, sulfametoxazol, trimetoprim, sulfadiazina, eritromicina, sulfadoxina, sulfamerazina, tilosina, ronidazol, sulfametizol, difloxacin e cloranfenicol ambos os métodos se mostraram adequado apresentando recuperações ente 76 e 117% e RSD ≤19%.

Os compostos danofloxacin e sarafloxacin não apresentaram resultados aceitáveis para o método “D”. Para estes analitos os valores de RSD (%) foram de 79 e 10%, respectivamente. Além disso, apresentaram valores de recuperação de 77 e 52%, respectivamente.

Dimetridazol, metronidazol, sulfaquinoxalina e florfenicol obtiveram resultados adequados utilizando o método D. Ainda, florfenicol-amina, sulfametazina, dilfubenzuron, teflubenzuron, tetraciclina, oxitetraciclina, cloretetraciclina, deltametrina e tianfenicol não tiveram resposta analítica suficiente para serem quantificados e avaliados em ambos os métodos testados.

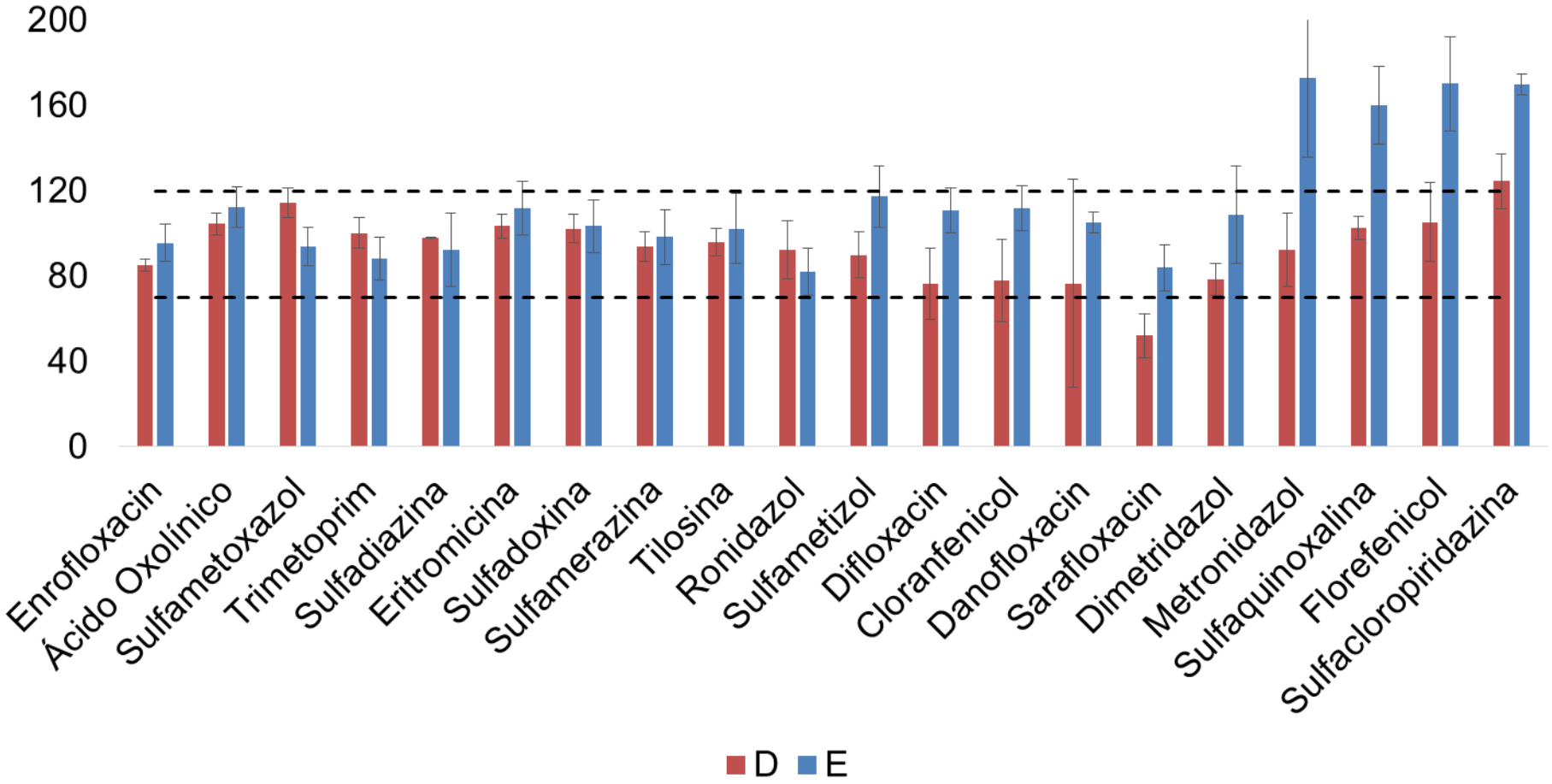
Neste contexto, o método D, utilizando acetonitrila e cloreto de sódio, poderia ser aplicado para 17 compostos. Por outro lado, o método E, utilizando acetonitrila contendo 5% (v/v) ácido acético e acetato de sódio, poderia ser aplicado para 15 compostos. Segundo a Tabela 2 (item 2.4.2), modificações para pH ácido e/ou adição de agentes complexantes foram empregados em diversas aplicações visandoa determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras oriundas da aquicultura.

A adição de agente complexante (como por exemplo o EDTA) pode auxiliar na extração de resíduos de tetraciclinas, uma vez que esta classe de antimicrobiano é conhecida por formar complexos com cátions bi e trivalentes presentes no extrato da

matriz (FREITAS et al., 2014). Comportamento semelhante pode ser observado pelas quinolonas (LOHNE et al., 2012) e aminoglicosídeos (KAUFMANN et al., 2012). Além disso, a adição do ácido tricloroacético também pode favorecer o aumento da eficiência de extração de compostos como as tetraciclinas (LIU et al., 2013).

Comparando-se os métodos QuEChERS original, acetato e citrato com os métodos adaptados para medicamentos veterinários (D e E) apenas o composto tianfenicol não apresentou resultados melhores utilizando os métodos adaptados para análise de medicamentos veterinários. Entretanto, os compostos cloretetraciclina, deltametrina, dilfubenzuron, florfenicol-amina, oxitetraciclina, sulfametazina, teflubenzuron e tetraciclina não puderam ser quantificados, em função do baixo sinal analítico, por nenhum dos métodos avaliados.

Figura 18 - Resultados de recuperação (%) para avaliação da etapa de extração de amostras utilizandos os métodos QuEChERS adaptados para medicamentos veterinários D e E



5.2.3 Otimização da etapa de extração sólido-líquido

A análise dos resultados obtidos pela aplicação destes métodos (item 4.2.2) deixa clara a necessidade de um estudo minuscioso do procedimento de extração, uma vez que muitos analitos não apresentaram recuperação considerável em nenhum dos métodos avaliados. Portanto, decidiu-se pelo estudo de cada uma das etapas separadamente. Através de um planejamento fatorial completo 3^2 foi possível avaliar a significância das variáveis avaliadas através da análise da variância (ANOVA) (Anexo –D), diagrama de pareto e diagramas de médias marginais.

A Tabela 16, apresenta a estimativa dos efeitos padronizados para as interações quadrática e linear entre as variáveis avaliadas (concentração de TCA e do EDTA utilizados).

Tabela 16 – Estimativa dos efeitos padronizados para percentagem de TCA e concentração de EDTA e suas interações lineares (L) e quadráticas (Q)

Compostos	TCA (L)	TCA (Q)	EDTA (L)	EDTA (Q)	TCA(L) x EDTA(L)	TCA(L) x EDTA(Q)	TCA(Q) x EDTA(L)	TCA(Q) x EDTA(Q)
Ácido Oxolínico		-2,2				-2,4		
Cloranfenicol	-3,2	-3,0	-2,2		2,6	-3,0		
Clortetraciclina	3,1	-2,5						
Deltametrina	-3,7							
Difloxacin	-4,8	-3,6	-3,2		3,1		2,7	
Dimetridazol	-3,5	-4,0						
Emamectina			-2,3	-2,3				
Enrofloxacin	-5,6	-4,8	-2,9		3,0		2,3	
Eritromicina	-7,8	-5,0	-4,0		5,2		3,3	
Florfenicol		-2,9			3,0	-3,4		
Metronidazole	-3,7	-4,3	-3,1		2,9			
Oxitetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-
Ronidazole	-4,2	-3,3	-2,8		2,3	-2,3	2,3	-2,4
Sarafloxacin	-4,2	-2,8			2,3			
Sulfacloropiridazina		-3,9			2,2	-2,4		
Sulfadiazina	-2,7	-3,1				-2,2		
Sulfadoxina		-2,4						
Sulfamerazina	-2,9	-4,9	-2,7					
Sulfametazina		-3,1						-2,5
Sulfametizol		-3,4				-2,1		
Sulfametoxazol		-3,6			2,5	-2,3		-2,3
Sulfaquinoxalina		-2,4						
Teflubenzuron		-2,3						

Compostos	TCA (L)	TCA (Q)	EDTA (L)	EDTA (Q)	TCA(L) x EDTA(L)	TCA(L) x EDTA(Q)	TCA(Q) x EDTA(L)	TCA(Q) x EDTA(Q)
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-
Tianfenicol	-2,4	-3,8						
Tilosina	-9,8	-6,3			2,2	-2,1		
Trimetoprim	-4,7	-4,2	-2,3		2,5	-2,2		-3,1

De acordo com a Tabela 16, a maioria dos efeitos foram negativos. Isto significa que o aumento das concentrações de TCA e de EDTA (dentro da faixa de estudo) prejudica a extração dos compostos avaliados. Portanto, as concentrações escolhidas foram TCA 1% (v/v) e EDTA 0,01 mol L^{-1}. Durante a realização deste experimento, percebeu-se que para estas variações no método de extração os compostos clortetraciclina, deltametrina, oxitetraciclina, sulfametazina, teflubenzuron, tetraciclina e tianfenicol apresentaram sinal analítico adequado (relação sinal/ruído > 10). Isto não foi observadoutilizando as diferentes versões testadas do método QuEChERS. Apenas o composto danofloxacin não foi avaliado, este apresentou diferença entre o tempo de retenção da transição de quantificação e da transição de identificação.

Esperava-se que a condição ótima para as variáveis analisadas fosse encontrada, entretanto, através do estudo é possível afirmar que a percentagem de TCA ideal está entre 0 e 1% e a concentração de EDTA ideal está entre 0 e 0,01 mol L^{-1}. Baseado nesta conclusão, questiona-se o uso destes aditivos. Portanto, um ensaio comparando a condição escolhida no planejamento e um método sem uso de aditivos ácidos ou complexantes foi necessário.

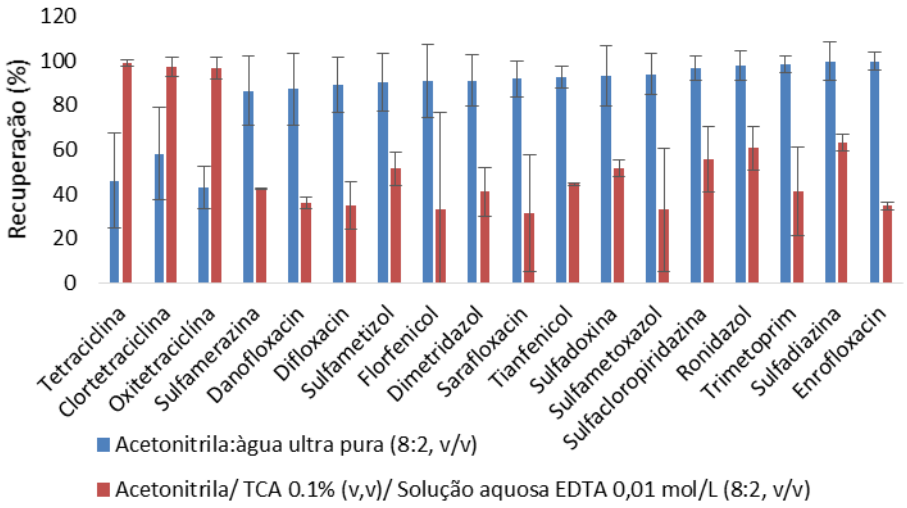
5.2.4 Avaliação da necessidade de aditivos no solvente de extração

Após verificar as melhores condições de aditivos no solvente de extração, foi realizado um teste comparativo, sem a adição de aditivos. Esse ensaio torna-se necessário devido a melhor condição estar situada nos limites da faixa de estudo para os aditivos avaliados. O ensaio foi realizado a fim de comparar duas combinações de solvente de extração:

- solução acetonitrila:água (8:2, v/v) e;
- soluçao acetonitrila 0,1% (v/v) TCA: solução aquosa EDTA 0,01 mol L^{-1} (8:2, v/v).

Os resultados desta comparação são apresentados na Figura 16.

Figura 19 – Recuperações obtidas utilizando duas combinações de solventes de extração durante etapa de preparo de amostra



O solvente de extração utilizando os aditivos TCA e EDTA apresentou os melhores resultados somente para os compostos pertencentes ao grupo das tetraciclinas (tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina). Estes compostos apresentaram valores recuperação entre 97 e 99% e RSD< 5%. A solução acetonitrila:água ultra-pura (8:2, v/v) apresetou maior eficiência de extração para todos os demais compostos, indicando que não seria necessária a adição de TCA e EDTA.

Os compostos cloranfenicol, deltametrina, eritromicina, metronidazol, ácido oxolínico, sulfametazina, sulfaquinoxalina, teflubenzuron, tilosina não apresentaram recuperações para o teste em questão.

Muitos trabalhos presentes na literatura utilizam aditivos nos solventes de extração para determinação de resíduos de tetraciclinas em amostras de origem animal. O ácido tricloroacético (GUIDI et al., 2017), a combinação de TCA e EDTA (LIU et al., 2013; ORLANDO; SIMIONATO, 2013), EDTA e outros tipos de aditivos ácidos (DONE; HALDEN, 2015; MONTEIRO et al., 2015) e somente EDTA (CHÁFER-PERICÁS et al., 2010, 2011; FREITAS et al., 2014; SANTOS et al., 2016; SERRA-COMPTE et al., 2016; YIPEL et al., 2016) já foram utilizados para a determinação de resíduos de tetraciclinas.

O TCA pode ser utilizado para promover a precipitação de proteínas durante o procedimento de extração, podendo aumentar a eficiência de extração das

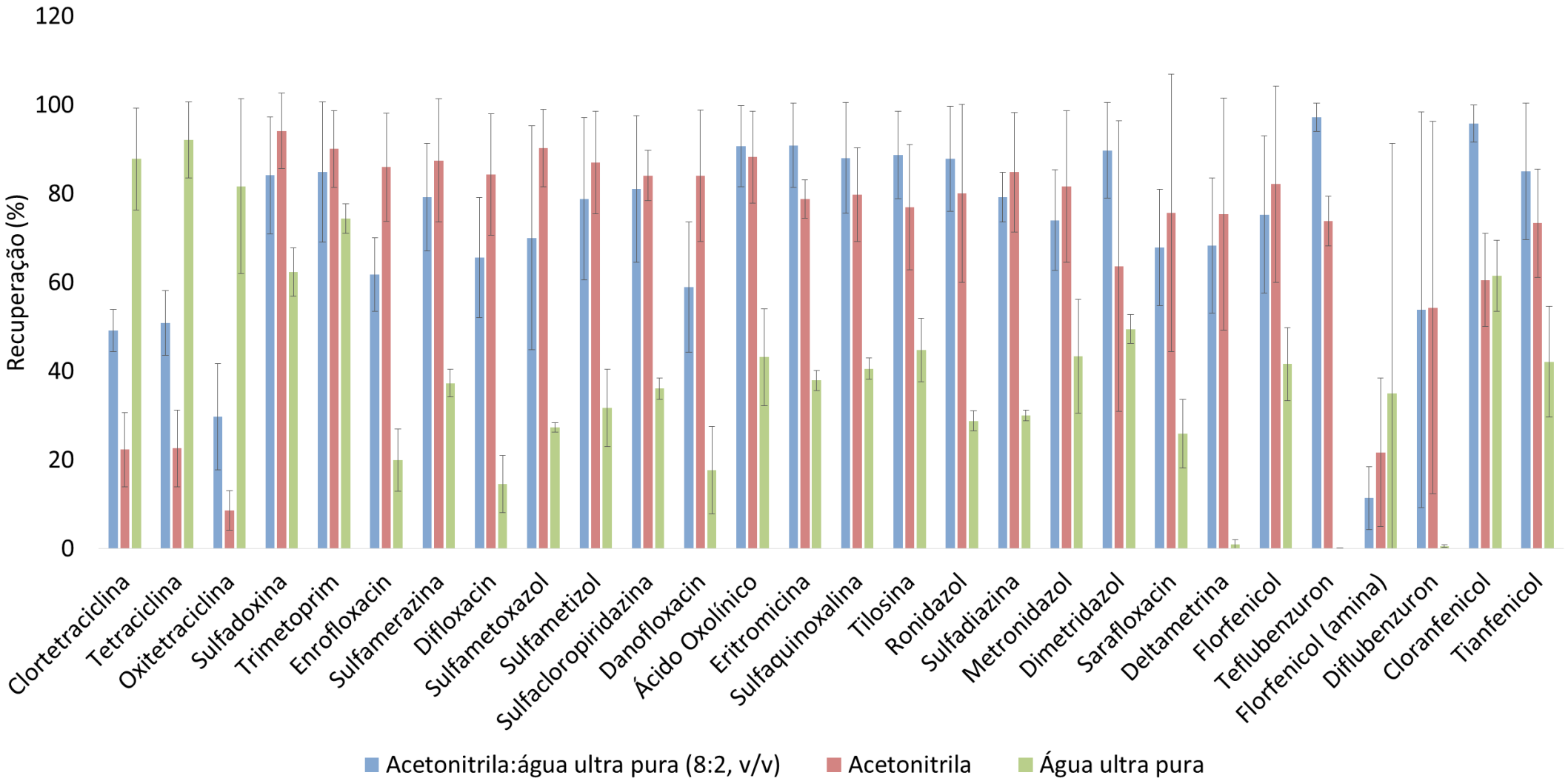
tetraciclinas. Enquanto o EDTA é utilizado devido a possibilidade de formação de complexos entre as tetraciclnas e cátions bivalentes (ORLANDO; SIMIONATO, 2013). Por outro lado, é possível encontrar na literatura métodos que utilizam apenas acetonitrila como solvente de extração para determinação de tetraciclinas em amostras de origem animal (REINHOLDS et al., 2016). Portanto, o uso de aditivos no solvente de extração não foi mais aplicado para extração dos resíduos de medicamentos veterinários no decorrer do trabalho.

5.2.5 Avaliação da composição do solvente de extração

Os aditivos TCA e EDTA não foram mais aplicado no desenvolvimento do método, portanto, um comparação entre diferentes solventes de extração foi aplicada. O objetivo é encontrar qual é o solvente ou mistura de solventes mais efetivo.

Os solventes acetonitrila, água e a solução acetonitrila:água (8:2, v/v) foram aplicados como solvente extrator e as recuperações para cada um dos solventes está representada na Figura 17.

Figura 20 – Recuperações obtidas utilizando água (verde) acetonitrila (vermelho) e acetonitrila:água (8:2, v/v)



Os resultados apresentados na Figura 17 indicam que as tetracilinas são melhores extraídas utilizando apenas água como solvente de extração, apresentando percentuais de recuperação entre 82 e 92%. O solvente acetonitrila proporcionou melhor eficiência de extração (84 e 94% de recuperação) para sulfadoxina, trimetoprim, enrofloxacin, sulfamerazina, difloxacin, sulfametoxazol, sulfametizol, sulfacloropiridazina e danofloxacin. Os demais 16 compostos tiveram maior eficiência de extração (54 e 97% de recuperação) quando a solução acetonitrila:água (8:2, v/v) foi utilizada.

Tendo em vista que a etapa de extração partiu de uma proporção 1:10 (1 g de amostra/10 mL solvente), os fatores de diluição do método tornam-se relevantes. Por isso, a necessidade de evaporação dos extratos, visando o aumento da concentração, é uma possibilidade a ser considerada. Etapas de evaporação de extrato são normalmente consideradas morosas e de baixa frequência analítica, dependendo dos equipamentos utilizados. A evaporação de soluções de solvente orgânico na presença de água, normalmente, necessita de mais tempo, exige temperaturas mais altas e envolve um gasto de nitrogênio maior, quando comparadas a solventes orgânicos puros.

Neste contexto, apesar de a maioria dos compostos em estudo apresentarem melhor eficiência de extração quando utilizada uma mistura acetonitrila:água, o solvente acetonitrila foi escolhido. Salienta-se, que este solvente também proporcionou resultados aceitáveis de recuperação (%) e RSD (%) para os compostos em estudo.

A fim de promover uma diminuição do fator de diluição do método (10x) e futuros problemas na concentação de extratos, como baixo volume de extrato obtido, necessitando de volumes de redissolução muito baixos, a quantidade de amostra foi aumentada para 5 g e o volume de acetonitrila foi alterado para 5 mL. Assim, a proporção amostra:solvente de extração seria de 1:1. Por outro lado, o método de limpeza do extrato (diluição seguido de limpeza em cartucho de SPE e filtros de seringa) não foi efetivo quando a relação 1:1 amostra/solvente foi utilizada. Portanto, novos métodos e técnicas de limpeza foram aplicados para diminuir a quantidade de co-extrativos da matriz presentes no extrato.

5.2.6 Avaliação da etapa de limpeza e/ou concentração da amostra

A remoção de gordura e outros co-extrativos, como por exemplo os fosfolipídeos, é essencial para garantir a confiabilidade da análise. A presença de co-extrativos da matriz pode prejudicar a integridade do sistema UHPLC-MS/MS (MAY et al., 2017). As estratégias utilizadas para limpeza de extrato podem envolver a extração com solvente (BARRETO et al., 2016) ou uso de sorventes de vários tipos como C18 (KAUFMANN et al., 2011), poliméricos (FREITAS et al., 2014) ou específicos para fosfolipídeos (REINHOLDS et al., 2016).

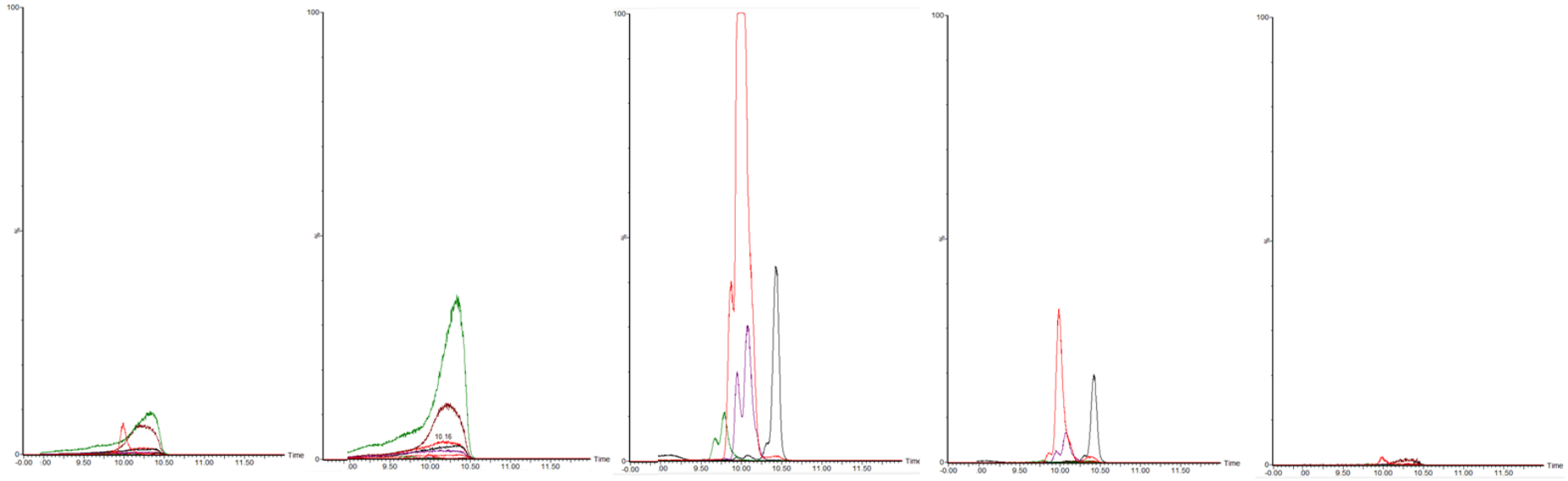
O sorvente Z-Sep+ consiste em uma mistura de C18 e partículas de silica ligadas a zircônia. As particulas de C18 são responsáveis por remover a gordura através de interações hidrofóbicas enquanto a zircônica age como um ácido de Lewis, atraindo grupos doadores de elétrons, como por exemplo as hidroxilas presentes em mono e diglicerídeos (SIGMA-ALDRICH, 2019).

Outra opção é o sorvente EMR-Lipid cuja tecnologia permite a remoção de lipídeos pela combinação dos mecanismos de exclusão por tamanho e interações hidrofóbicas (AGILENT, 2019b).

Para avaliação da etapa de limpeza de extrato foi utilizado um método para determinação de fosfolipídeos por UHPLC-MS/MS adaptado. O método tem como objetivo a determinação de fosfolipídeos contendo ácidos graxos de 14 a 22 carbonos. O método é aplicado para a avaliação da redução da concentração de fosfolipídeos após a realização da etapa de limpeza dos extratos (SHIMADZU, 2019).

Os cromatogramas obtidos para avaliação do perfil de fosfolipídeos após a limpeza do extrato de amostra de salmão (*Salmo Salar*) com o uso de diferentes sorventes e técnicas podem ser visualizados na Figura 18. O uso de EMR-Lipid foi anteriormente relatado como sorvente para etapa de limpeza para a determinação de agrotóxicos e contaminantes ambientais em couve, abacate, salmão e suínos (HAN et al., 2016).

Figura 21 – Cromatogramas obtidos para o perfil de fosfolipídeos de extratos de amostras de salmão submetidos a diferentes procedimentos de limpeza



1) C18 d-SPE (125 mg/ 1 mL) 2) Z-Sep+ d-SPE (125 mg/ 1 mL) 3) EMR d-SPE (125 mg/ 1 mL) 4) Captiva SPE (0.2 um/ 1 mL) 5) EMR SPE (40 mg/ 1 mL)

Devido a intensidade de sinal mais baixa, apresentada pelos extratos que passaram pelo procedimento de SPE utilizando EMR-Lipid como sorvente este foi o procedimento escolhido para o decorrer do desenvolvimento. Este resultado demonstra uma maior remoção dos fosfolipídeos presentes no extrato.

5.2.7 Método de extração de resíduos de medicamentos veterinários em salmão

O método de preparo de amostra proposto neste trabalho foi realizado utilizando 5 g de amostra (*Salmo Salar*) em tubo de centrífuga de 50 mL e 5 mL de acetonitrila como solvente extrator. As amostras foram homogeneizadas por 20 s em ultra-turrax à 10 000 rpm. As amostras foram centrifugadas a 2137 × g por 8 min a 10 °C. Para a etapa de limpeza, 2 mL de extrato foram adicionados a 3 mL de água ultra-pura e homogeneizados por 20 s em vortex, 1 mL de extrato foi submetido a SPE utilizando cartucho EMR-Lipid (40 mg) e filtrados com filtros de seringa (PTFE, 13 mm e porosidade de 0,2 µm) e injetados no sistema UHPLC-MS/MS.

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM AMOSTRAS DE SALMÃO

O método foi validado de acordo com base na norma 2002/657/EC e SANTE, 2017.

A seletividade pode ser observada pela Figura 19, onde foi realizada a sobreposição de um cromatograma SRM obtido pela injeção de uma solução padrão na concetração de 25 µg L^{-1} e um cromatograma de uma amostra “branco” de salmão.

Além da sobreposição dos cromatogramas a verificação da razão entre os íons de quantificação e identificação das amostras apresentaram variação na faixa de ± 30% segundo (SANTE, 2015). A razão entre os íons de indentificação e quantificação, bem como os LOD, LOQ, CCα, CCβ, efeitos de matriz, recuperações e desvios para precisão e precisão intermediária podem ser visualizados na Tabela 17.

Figura 22 – Cromatograma SRM de uma solução padrão na concentração de 50 µg L^{-1} de uma amostra “branco” de salmão fortificada.

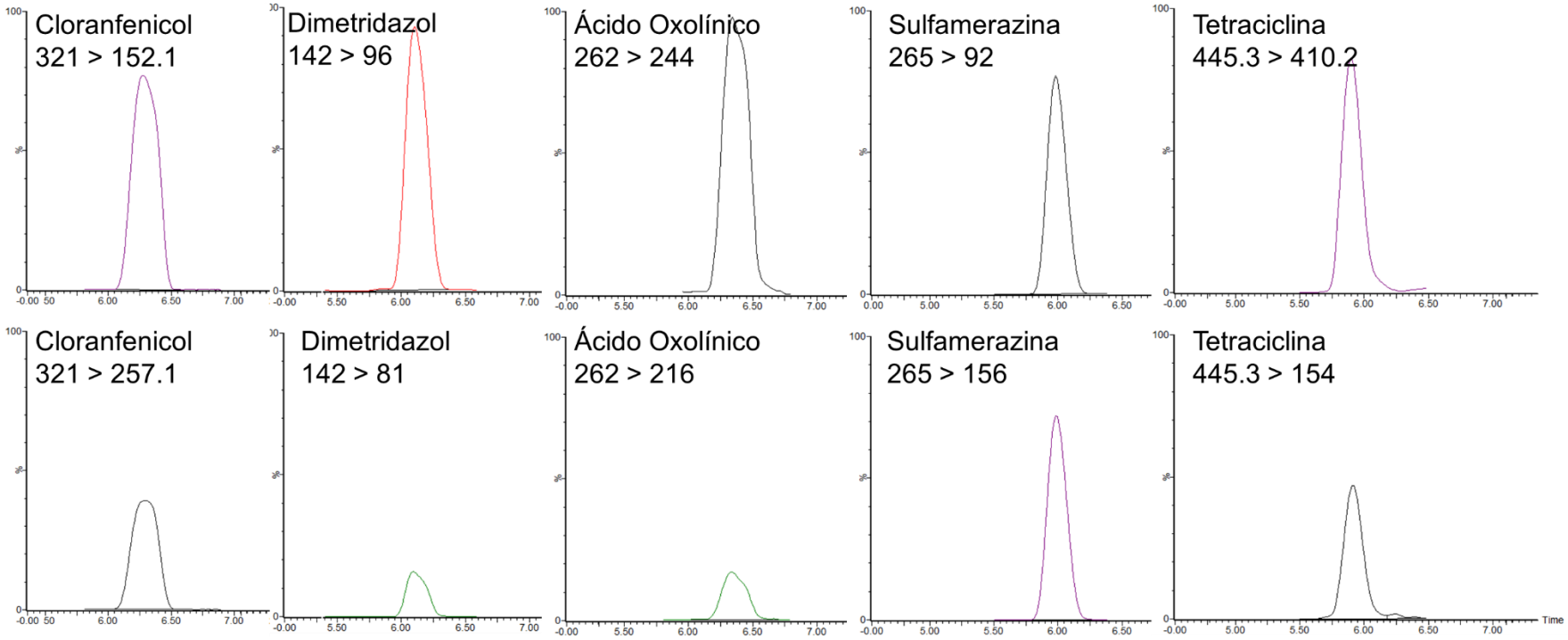


Tabela 17 – Resultados de recuperação (%), desvio padrão relativo (%) para precisão e precisão intermediária, LOD (µg kg^{-1}), LOQ (µg kg^{-1}), CCα (µg kg^{-1}), CCβ (µg kg^{-1}), efeitos de matriz (%) e razão entre íons de identificação e quantificação

	LMR	5 µg kg^{-1}		12.5 µg kg^{-1}		25 µg kg^{-1}		50 µg kg^{-1}		125 µg kg^{-1}		LOD	LOQ/CCα	CCβ	Efeito de Matriz	Razão de íons
		Recuperação (RSD) (%)														
	(µg kg^{-1})	Precisão	Precisão Int.	Precisão	Precisão Int.	Precisão	Precisão Int.	Precisão	Precisão Int.	Precisão	Precisão Int.		(µg kg^{-1})		(%)	(%)
Dimetridazol	-	108(5)	109(6)	102(10)	101(4)	94(14)	95(9)	99(9)	100(10)	100(13)	100(13)	1.5	5	5.5	-32	16
Metronidazol	-	120(20)	112(5)	104(8)	101(8)	98(9)	94(9)	98(12)	100(4)	100(11)	100(10)	1.5	5	6.6	-39	40
Ronidazol	-	106(13)	106(7)	103(6)	99(9)	96(6)	94(15)	97(9)	102(4)	100(11)	100(11)	1.5	5	6.1	-45	27
Sulfadiazina	100	117(24)	109(16)	89(5)	93(12)	94(18)	95(14)	102(12)	100(1)	100(13)	100(12)	1.5	5	7.0	-38	86
Sulfametoxazol	100	125(13)	118(11)	97(9)	96(10)	95(15)	96(7)	96(10)	98(6)	101(12)	101(16)	1.5	5	6.1	-31	96
Ácido Oxolínico	20	125(0)	-	92(26)	-	98(8)	101(4)	104(10)	99(10)	99(11)	100(16)	7.5	25	28.3	-31	18
Sulfamerazina	100	112(17)	115(5)	101(12)	102(10)	97(12)	95(14)	96(8)	98(5)	101(14)	101(13)	1.5	5	6.4	-33	92
Sulfametizol	100	101(20)	104(14)	102(7)	107(15)	101(9)	99(11)	98(10)	97(6)	100(13)	100(11)	1.5	5	6.6	-35	58
Sulfametazina	100	111(10)	114(6)	104(7)	102(4)	99(6)	93(9)	95(8)	98(6)	101(12)	100(13)	1.5	5	5.8	-19	57
Sulfacloropiridazina	100	108(21)	115(9)	97(14)	100(6)	98(11)	97(9)	99(10)	96(5)	100(16)	101(13)	1.5	5	6.7	-23	59
Trimetoprim	100	91(14)	115(12)	91(18)	101(15)	97(7)	91(10)	106(10)	98(5)	99(12)	101(13)	1.5	5	6.1	-44	72
Sulfaquinoxalina	100	98(38)	126(17)	86(18)	107(4)	107(17)	93(5)	106(11)	94(6)	99(12)	101(12)	3.8	12.5	16.2	-17	63
Sulfadoxina	100	107(9)	120(7)	105(4)	102(5)	97(6)	93(6)	97(7)	95(6)	100(13)	101(15)	1.5	5	5.7	-19	60
Tetraciclina	100	143(19)	129(3)	94(4)	107(15)	96(13)	71(9)	92(9)	99(11)	101(11)	101(7)	3.8	12.5	15.6	-32	60
Oxitetraciclina	100	88(7)	202(10)	98(11)	106(19)	109(19)	72(6)	98(11)	75(18)	100(12)	101(8)	3.8	12.5	16.4	-22	85
Clortetraciclina	100	137(20)	130(11)	111(14)	120(4)	98(7)	95(14)	98(16)	90(9)	100(15)	102(14)	3.8	12.5	15.4	-11	78
Cloranfenicol	0.3*	-	112(15)	94(16)	103(10)	110(16)	104(10)	101(11)	93(17)	100(19)	84(9)	3.8	12.5	15.8	204	50
Tianfenicol	50	-	112(46)	72(8)	117(19)	118(14)	105(15)	106(16)	90(14)	98(19)	94(15)	3.8	12.5	16.4	32	46

*No caso do composto cloranfenicol o limite apresentado como referência é o LMDR (Limite Mínimo de Desempenho Requerido)

O método otimizado não apresentou resultados confiáveis dentro da faixa de trabalho avaliada para 11 compostos florfenicol (amina), diflubenzuron, deltametrina, florfenicol, danofloxacin, enrofloxacin, teflubenzuron, sarafloxacin, difloxacin, eritromicina e tilosina. O composto deltametrina apresentou problemas de linearidade (r^2= 0,67) para todas as curvas de calibração avaliadas. Os outros 10 compostos não tiveram eficiência de extração suficiente em concentrações abaixo dos 125 µg kg^{-1}.

Entre os compostos validados, apenas cloranfenicol não apresentou valor de LOQ suficiente para ser quantificado e identificado de acordo com o LMR estabelecido pela legislação. O cloranfenicol é um princípio ativo de uso proibido e portanto qualquer concentração encontrada na amostra é passível de condenação pelos órgãos de fiscalização. Logo, os métodos aplicados na determinação de resíduos de cloranfenicol devem apresentar um desempenho mínimo para condeção de amostras. O limite mínimo de desempenho requerido para determinação de cloranfenicol em amostras de salmão é de 0,3 µg kg^{-1}. A estimativa do limite de detecção para cloranfenicol foi de 3,8 µg kg^{-1}. Portanto,sua quantificação só pode ser realizada com segurança a partir de 12,5 µg kg^{-1}. O método apresentado não atingiu desempenho mínimo para a determinação de cloranfenicol, sendo necessária uma etapa de evaporação para atingir um fator de concentração de extrato de no mínimo 13 vezes.

Os outros compostos apresentaram limites de quantificação abaixo dos limites máximos de resíduo exigidos e recuperações que variaram entre 71 e 120% e desvios menores do que 24% para precisão e precisão intermediária.

Os compostos sulfadoxina, sulfametazina, sulfaquinoxalina e clortetraciclina não apresentaram efeitos de matriz consideráveis (entre -20 e 20%). O composto tianfenicol apresentou efeito de matriz positivo de 32%. O efeito de matriz do composto cloranfenicol foi de 204%. O restante dos compostos apresentou efeito de matriz negativo, demonstrando supressão na etapa de ionização, com resultados variando entre -22 e -45%.

5.4 Aplicação do método em amostras reais

O método validado foi aplicado para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em 15 amostras de salmão por UHPLC-MS/MS. Apenas uma das amostras apresentou resíduos de clortetraciclina abaixo do LOQ. Nos últimos anos os resultados dos programas de monitoramento, como por exemplo o PNCRC,

não tem apresentado resultados positivos para presença de resíduos de medicamentos em amostras de peixes de cativeiro (MAPA, 2017b). No portal RASFF, não foram relatados eventos devido a presença de resíduos de medicamentos veterinários nos últimos dois anos (RASFF, 2019). Em partes, estes resultados podem ser explicados pela implementação de políticas de controle do uso de medicamentos, como é o caso do Chile. Em 2015, foi implementado o Manual de boas práticas no uso de antimicrobianos e antiparasitários na salmonicultura chilena, baseado em estudos realizados desde 2010. Entre várias medidas e observações destaca-se o artigo 86 da lei geral de Pesca e Aquicultura onde proíbe-se o uso de medicamentos veterinários para produção de salmão de maneira profilática (CHILE, 2015).

6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de um método para determinação de resíduos de medicamentos veterinários utilizando o sistema UHPLC-MS/MS foi apresentado. O desenvolvimento pode ser divido em três etapas principais: o desenvolvimento de um método para o sistema UHPLC-MS/MS; o desenvolvimento de método de preparo de amostras; e a validação do método, juntanmente com a sua aplicação em amostras reais.

Os resultados apresentados para as condições de composição da fase móvel empregada demonstrou a necessidade da aplicação de um estudo para atingir a máxima intensidade de sinal para os compostos em estudo. Enquanto algumas classes como as sulfonamidas sofrem pouca, ou nenhuma mudança significativa de sinal, conforme adiciona-se formiato de amônio e/ou ácido fórmico a fase móvel, ou ainda, utiliza-se metanol e/ou acetonitrila como eluente orgânico, outras classes, como por exemplo, as benzamidas, apresentam alta variação do sinal analítico.

As mudanças de coluna cromatográfica e gradientes de eluição realizados neste estudo não foram suficiente para melhorar a resolução cromatográfica. Neste mesmo sentido, o acoplamento da técnica UHPLC a MS/MS provou ser essencial para determinação de resíduos de medicamentos veterinários de classes diferentes em uma mesma análise. Apesar de não interferir na eficiência de separação, a coluna cromatografica e o gradiente de eluição podem causar assimetria dos picos referentes aos compostos em estudo, prejudicando a identificação e quantificação dos mesmos.

Mesmo que a vazão da fase móvel seja um dos parâmetros mais significativos no que diz respeito a separação cromatográfica, ela também provou ser um parâmetro significativo para a intensidade de sinal obtida para os compostos em estudo. O aumento significativo da área obtida, quando utilizaram-se vazões de fase móvel de 100 µL min^{-1}, pode ser relacionado a uma maior eficiência durante a etapa de ionização por eletronebulização, visto que um aumento da temperatura do gás de dessolvatação também foi significativo para o aumento da intensidade de sinal. Apesar do aumento considerável, ainda há outras variáveis que podem influenciar na eficiência durante a etapa de ionização por eletronebulização, como por exemplo a vazão do gás de dessolvatação, e portanto podem ser explarados em trabalhos futuros.

O método QuEChERS original e suas modificações, utilizadas para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, apresentaram resultados de recuperação e RSD insuficientes. Apesar de apresentar resultados de recuperação e desvios mehores, as modificações aplicadas ao método QuEChERS, visando a determinação de resíduos de medicamentos veterinários não apresentaram resultados satisfatórios para alguns dos compostos em estudo.

A necessidade de aplicações de aditivos ácidos e complexantes ao solvente de extração não foi comprovada, sendo que para muitos compostos em estudo melhores recuperações foram obtidos através de extração com solução de acetonitrila:água (8:2, v/v). A extração dos resíduos de medicamentos veterinários em peixe com solução água:acetonitrila (8:2, v/v) foi mais eficiênte quando comparada aos solventes puros (água e acetonitrila). Todavia, a presença de água no extrato representa uma dificuldade na aplicação de outras etapas, como a evaporação, caso necessário diminuir os LOQs do método, como por exemplo para o composto cloranfenicol. O solvente acetonitrila demonstrou eficiência de extração adequada para extração de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de salmão.

O aumento da quantidade de amostra aplicada a extração implica no aumento de co-extrativos presentes no extrato final. Uma etapa de limpeza eficaz foi possível pela aplicação do sorvente EMR-Lipid em cartuchos para 1 mL de extrato. A diluição do extrato previamente a etapa de limpeza contribui para retirada de co-extrativos garantindo a integridade do sistema UHPLC-MS/MS.

O método proposto apresentou seletividade, exatidão, precisão, LODs, LOQs, CCas, CCbs suficientes para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de salmão por UHPLC-MS/MS demonstrando confiabilidade em laboratórios de análise de rotina. Neste sentido, a aplicação do método em amostras reais de salmão demostra a aplicabilidade do método. O método desenvolvido é rápido, de simples execução, confiável, com baixo consumo de solvente de extração (5 mL por amostra) e baixo consumo de fase móvel (1 mL por amostra), é possível de ser realizado com equipamentos simples de laboratório (ultraturarx e centrífuga), além de reagentes comuns a qualquer laboratório de análises de rotina (acetonitrila, metanol, água ultra-pura, ácido fórmico, cartuchos EMr-Lipid e filtros de seringa).

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em vista do alto limite de detecção para o composto cloranfenicol, uma etapa de evaporação poderia ser avaliada durante o procedimento de extração visando diminuir os limites obtidos pelo método validado.

Para os compostos florfenicol (amina), diflubenzuron, deltametrina, florfenicol, danofloxacin, enrofloxacin, teflubenzuron, sarafloxacin, difloxacin, eritromicina e tilosina outras alternativas poderiam ser realizadas.

O composto deltametrina, pertencente ao grupo dos piretórides, tem como limite máximo de resíduo definido 10 µg kg^{-1}, poderia ser avaliado utilizando o método cromatográfico número 14 da Tabela 10. A solução acetonitrila 1% TCA (v/v):água ultra pura (8:2, v/v) foram mais efetivas na extração deste composto das amostras de salmão e poderia ser avaliada.

O composto sarafloxacin, pertence ao grupo das quinolonas, tem como limite máximo de resíduo definido 30 µg kg^{-1} poderia ser avaliado utilizando o método cromatográfico número 18 da Tabela 10. O preparo de amostra utilizando método QuEChERS modificado, utilizando acetonitrila 5% ácido acético e adição de acetato de sódio como sla de partição apresentou recuperações adequadas para o composto e poderia ser avaliado.

Os demais compostos florfenicol, florfenicol (amina) e diflubenzuron (com LMR 1 mg kg^{-1}); teflubenzuron (com LMR 0,5 mg kg^{-1}); difloxacin (com LMR 0,3 mg kg^{-1}); eritromicina (com LMR 0,2 mg kg^{-1}) e; danofloxacin, enrofloxacin e tilosina (com LMR 0,1 mg kg^{-1}) poderiam ser avaliados utilizando o mesmo método validado, mudando-se apenas a faixa de trabalho. Ao invés de uma faixa de concentrações entre 2,5 à 125 µg kg^{-1}, intervalos entre 0,05 mg kg^{-1} (50 µg kg^{-1}) a 1 mg kg^{-1} (1000 µg kg^{-1}) poderiam ser explorados.

REFERÊNCIAS

ADEGOKE, O. A. et al. **Simultaneous spectrophotometric determination of trimethoprim and sulphamethoxazole following charge-transfer complexation with chloranilic acid**. Arabian Journal of Chemistry, jun. 2014.

AGILENT. Captiva EMR-Lipid | Agilent. Disponível em: <https://www.agilent.com/en/products/sample-preparation/sample-preparation-methods/filtration/captiva-emr-lipid>. Acesso em: 14 jan. 2019b.

AGILENT. ZORBAX Eclipse Plus | Agilent. Disponível em: <https://www.agilent.com/en/products/liquid-chromatography/lc-columns/small-molecule-separations/zorbax-eclipse-plus>. Acesso em: 10 jan. 2019a.

ALBASEER, S. S. et al. **Analytical artifacts, sample handling and preservation methods of environmental samples of synthetic pyrethroids**. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 30, n. 11, p. 1771–1780, dez. 2011.

ANASTASSIADES, M. et al. **Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce**. Journal of AOAC International, v. 86, n. 2, p. 412–431, abr. 2003.

ANVISA. Processo regulatório: Anvisa discute medicamentos veterinários em alimentos. 2018. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-discute-medicamentos-veterinarios-em-alimentos/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=pt_BR. Acesso em: 18 de fev de 2019

Associação Brasileira da Piscicultura. Disponível em: <http://www.peixebr.com.br/a-piscicultura-brasileira-quer-ficar-no-ministerio-da-agricultura-pecuaria-e-abastecimento/>. Acesso em: 21 mar. 2017.

AUFARTOVÁ, J. et al. **Determination of fluoroquinolones in fishes using microwave-assisted extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography and fluorescence detection**. Journal of Food Composition and Analysis, v. 56, p. 140–146, 2017.

BANDEIRA, N. M. G. et al. **Evaluation of QuEChERS Sample Preparation for Determination of Avermectins Residues in Ovine Muscle by HPLC-FD and UHPLC-MS/MS**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 28, p. 878 – 886, 2017.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.-L.; CANTÓN, R. **Antibiotics and antibiotic resistance in water environments**. Current Opinion in Biotechnology, Energy biotechnology/Environmental biotechnology. v. 19, n. 3, p. 260–265, jun. 2008.

BARRETO, F. et al. **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 - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, v. 29, n. 4, p. 550–558, 2012.

BARRETO, F. et al. **Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, v. 1449, p. 48–53, 3 jun. 2016.

EC, European Commision. Blue Growth: opportunities for marine and maritime sustainable growth. 13 set. 2012.

BRASIL. **Aquicultura tem potencial para dobrar produção em cinco anos**. Notícia. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/06/aquicultura-tem-potencial-para-dobrar-producao-em-cinco-anos>. Acesso em: 11 maio. 2017.

BURRIDGE, L. et al. **Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects**. Aquaculture, v. 306, n. 1–4, p. 7–23, 15 ago. 2010.

CABELLO, F. C. **Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment**. Environmental Microbiology, v. 8, n. 7, p. 1137–1144, jul. 2006.

CEN/TC 275. BS EN 15662 Foods of plant origin - **Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method**, 2008.

CHÁFER-PERICÁS, C. et al. **Multiresidue determination of antibiotics in aquaculture fish samples by HPLC-MS/MS**. Aquaculture Research, v. 41, n. 9, p. e217–e225, 2010.

CHÁFER-PERICÁS, C. et al. **Multiresidue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation. Comparison of immunoassay vs LC-MS-MS**. Food Control, v. 22, n. 6, p. 993–999, 2011.

CHILE. **Manual de buenas prácticas en el uso de antimicrobianos y antiparasitarios en salmonicultura chilena**. Ministerio de Economía Fomento y Turismo, 2015.

CD/657/2002. COMMISSION DECISION 657 of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002.

CR/37/2010. COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010. , 2010.

COOPER, K. M. et al. **Anthelmintic drug residues in beef: UPLC-MS/MS method validation, European retail beef survey, and associated exposure and risk assessments**. Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, v. 29, n. 5, p. 746–760, 2012.

Council Dierective 2006/88/EC. , 24 out. 2006. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0088&from=EN>. Acesso em: 14 dez. 2016

DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. **Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC–ESI–MS/MS approach based on advanced mass spectrometric techniques**. Analytica Chimica Acta, Selected Papers from the 4th International Symposium on Recent Advances in Food AnalysisRAFA 2009. v. 672, n. 1–2, p. 93–102, 5 jul. 2010.

DE FARIA, R. H. S. et al. **Manual de criação de peixes em viveiros**. Anaí Nabuco/Lettera Comunicação, 2014. Disponível em: <http//:www.codevasf.gov.br/publicacoes>. Acesso em: 23 jan. 2017

DENOBILE, M.; NASCIMENTO, E. DE S. **Method validation for the determination of the antibiotics residues oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in milk by high performance liquid chromatography**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 40, n. 2, p. 209–218, jun. 2004.

DICKSON, L. C. **Performance characterization of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for 12 macrolide and lincosamide antibiotics in salmon, shrimp and tilapia**. Journal of Chromatography B, v. 967, p. 203–210, 15 set. 2014.

DMITRIENKO, S. G. et al. **Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection – A review**. Analytica Chimica Acta, v. 850, p. 6–25, 19 nov. 2014.

DONE, H. Y.; HALDEN, R. U. **Reconnaissance of 47 antibiotics and associated microbial risks in seafood sold in the United States**. Journal of Hazardous Materials, v. 282, p. 10–17, 2015.

FAO. FAO Fisheries & Aquaculture - Cultured Aquatic Species Information Programme - Salmo salar (Linnaeus, 1758). Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo_salar/en>. Acesso em: 30 jan. 2019a.

FAO. **SOFIA 2018 - State of Fisheries and Aquaculture in the world 2018**. Disponível em: <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>. Acesso em: 22 jan. 2019b.

FAROUK, F.; AZZAZY, H. M. E.; NIESSEN, W. M. A. **Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review**. Analytica Chimica Acta, v. 890, p. 21–43, 26 ago. 2015.

FORTT Z, A.; CABELLO C, F.; BUSCHMANN R, A. **Residues of tetracycline and quinolones in wild fish living around a salmon aquaculture center in Chile**. Revista chilena de infectología, v. 24, n. 1, p. 14–18, fev. 2007.

FREITAS, A. et al. **Multi-residue and multi-class determination of antibiotics in gilthead sea bream (Sparus aurata) by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. Food Additives and Contaminants -

Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, v. 31, n. 5, p. 817–826, 2014.

GADAJ, A. et al. **Determination of nitroimidazole residues in aquaculture tissue using ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography B, v. 960, p. 105–115, 1 jun. 2014.

GBYLIK, M. et al. **Multi-residue determination of antibiotics in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, v. 30, n. 6, p. 940–948, 2013.

GOSSETI, F.; MAZZUCO, E ZAMPIERI, D.; GENNARO, M. C. **Signal suppression /enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1217, p. 3929-3937, 2010.

GUIDI, L. R. et al. **Advances on the chromatographic determination of amphenicols in food**. Talanta, v. 162, p. 324–338, 1 jan. 2017.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. **Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents**. Química Nova, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HERNÁNDEZ-ARTESEROS, J. A. et al. **Analysis of quinolone residues in edible animal products**. Journal of Chromatography A, v. 945, n. 1–2, p. 1–24, 1 fev. 2002.

HUANG, P. et al. **Trace determination of antibacterial pharmaceuticals in fishes by microwave-assisted extraction and solid-phase purification combined with dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometr**y. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 1011, p. 136–144, 2016.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2015/default.shtm>. Acesso em: 21 mar. 2017

INMETRO. DOQ-CGCRE-008: ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. Revisão 07 – Julho 2018.

JANSOMBOON, W. et al. **Monitoring and determination of sulfonamide antibiotics (sulfamethoxydiazine, sulfamethazine, sulfamethoxazole and sulfadiazine) in imported Pangasius catfish products in Thailand using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry**. Food Chemistry, v. 212, p. 635–640, 2016.

KAUFMANN, A. et al. **Development of an improved high resolution mass spectrometry based multi-residue method for veterinary drugs in various food matrices**. Analytica Chimica Acta, v. 700, n. 1-2, p. 86–94, 2011.

KAUFMANN, A.; BUTCHER, P.; MADEN, K. **Determination of aminoglycoside residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry in a variety of matrices**. Analytica Chimica Acta, v. 711, p. 46–53, 20 jan. 2012.

KEMMERICH, M. et al. **Optimization by Central Composite Design of a Modified QuEChERS Method for Extraction of Pesticide Multiresidue in Sweet Pepper and Analysis by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry**. Food Analytical Methods, v. 8, n. 3, p. 728–739, 1 mar. 2015.

KINSELLA, B. et al. **Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis**. Journal of Chromatography A, Hormones and Veterinary DrugsState-of-the-art and emerging technologies. v. 1216, n. 46, p. 7977–8015, 13 nov. 2009.

KUMAR, V.; ROY, S. **Aquaculture Drugs: Sources, Active Ingredients, Pharmaceutic Preparations and Methods of Administration**. Journal of Aquaculture Research & Development, v. 08, n. 09, 2017.

LEHOTAY, S. J. **Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study**. Journal of AOAC International, v. 90, n. 2, p. 485–520, abr. 2007.

LÉO, V. F. et al. **Farmacocinética e Farmacodinâmica da associação das Sulfas e Trimetoprim**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, v. 12, jan. 2009.

LI, J. et al. **A novelty strategy for the fast analysis of sulfonamide antibiotics in fish tissue using magnetic separation with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry**. Biomedical Chromatography, v. 30, n. 8, p. 1331–1337, 2016.

LIMA, A. F. et al. **Manual de piscicultura familiar em viveiros escavados**. 1a. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2015.

LIU, Y. et al. **High-performance liquid chromatography using pressurized liquid extraction for the determination of seven tetracyclines in egg, fish and shrimp**. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 917-918, p. 11–17, 2013.

LOHNE, J. J. et al. **Laser diode thermal desorption mass spectrometry for the analysis of quinolone antibiotic residues in aquacultured seafood**. Rapid Communications in Mass Spectrometry, v. 26, n. 24, p. 2854–2864, 2012.

MAHUGO-SANTANA, C. et al. **Analytical methodologies for the determination of nitroimidazole residues in biological and environmental liquid samples: A review**. Analytica Chimica Acta, v. 665, n. 2, p. 113–122, 30 abr. 2010.

MANISALI, I.; CHEN, D. D. Y.; SCHNEIDER, B. B. **Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future**. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 25, n. 3, p. 243–256, mar. 2006.

MAPA. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários. 1ª edição, 2011.

MAPA. Manual de Coleta de Amostras do PNCRC / MAPA — Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/manual-de-coleta-de-amostras-2010.pdf/view>. Acesso em: 11 fev. 2017a.

MAPA. RESULTADOS GERAIS DO SUBPROGRAMA DE MONITORAMENTO E SUBPROGRAMA EXPLORATÓRIO DO PLANO NACIONAL DE CONTROLE DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES – PNCRC 2015, 2017.

MAPA. Importação de Produtos de Origem Animal. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/importacao-de-produtos-de-origem-animal#requisitos-sanit-rios-de-importa--o. Acesso em : 18 de fev de 2019.

MARTINEZ, J. L. **The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria**. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, v. 276, n. 1667, p. 2521–2530, 22 jul. 2009.

MARTINS, M. L. et al. **Dilution standard addition calibration: A practical calibration strategy for multiresidue organic compounds determination**. Journal of Chromatography A, v. 1460, p. 84–91, 19 ago. 2016.

MAY, M. M. et al. **Determination of Pesticide Residues in Soy-Based Beverages Using a QuEChERS Method (with Clean-Up Optimized by Central Composite Design) and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry**. Food Analytical Methods, p. 1–10, 4 jul. 2016.

MCGLINCHEY, T. A. et al. **A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices**. Analytica Chimica Acta, v. 624, n. 1, p. 1–15, 22 ago. 2008.

MONTEIRO, S. H. et al. **Multiresidue antimicrobial determination in Nile tilapia (Oreochromis Niloticus) cage farming by liquid chromatography tandem mass spectrometry**. Aquaculture, v. 447, p. 37–43, 2015.

NBR ISO 22000. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, , 2006.

NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H. **A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation**. Analytica Chimica Acta, v. 656, n. 1–2, p. 8–35, 10 dez. 2009.

ÖNAL, A. **Overview on liquid chromatographic analysis of tetracycline residues in food matrices**. Food Chemistry, v. 127, n. 1, p. 197–203, 1 jul. 2011.

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

ORSO, D. et al. **Simultaneous Determination of Multiclass Pesticides and Antibiotics in Honey Samples Based on Ultra-High Performance Liquid**

Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Food Analytical Methods, v. 9, n. 6, p. 1638–1653, 26 jul. 2016.

PAN, X.-D. et al. **Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol in fish muscle by matrix solid-phase dispersion extraction (MSPD) and ultra-high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry**. Food Control, v. 52, p. 34–38, jun. 2015.

PRESTES, O. D. et al. **O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas**. Química Nova, v. 36, n. 5, p. 697–710, 2013.

PUBCHEM. The PubChem Project. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 29 mar. 2017.

RASFF - Food and Feed Safety Alerts - Food Safety - European Commission. Disponível em: </food/safety/rasff_en>. Acesso em: 20 mar. 2017.

Regulamento (CEE) No 2377/90 do Conselho. Disponível em: <https://ec.europa.eu/health/veterinary-use/maximum-residue-limits/developments_en>. Acesso em: 3 jun. 2017.

REINHOLDS, I. et al. **The application of phospholipid removal columns and ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry for quantification of multi-class antibiotics in aquaculture samples**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 128, p. 126–131, 2016.

SALMONCHILE. Salmonchile. Disponível em: <http://www.salmonchile.cl/pt/ciclo-del-salmon.php>. Acesso em: 30 jan. 2019.

SANTE. SANTE, EUROPEAN COMMISSION. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document no SANTE/11945/2015, 2015. Disponível em: <http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmplt_article.asp?CntID=727>. Acesso em: 15 jul. 2016.

SANTOS, L. et al. **Detection and Quantification of 41 Antibiotic Residues in Gilthead Sea Bream (Sparus aurata) From Aquaculture Origin, Using a Multiclass and Multi-residue UHPLC-MS/MS Method**. Food Analytical Methods, v. 9, n. 10, p. 2749–2753, 2016.

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

SERRA-COMPTE, A. et al. **Multi-residue method for the determination of antibiotics and some of their metabolites in seafood**. 2016. Scopus.

SHIMADZU. LC/MS/MS MRM Library for Phospholipid Profiling. Disponível em: <https://www.shimadzu.com/an/lcms/phospholipid_profiling.html>. Acesso em: 14 jan. 2019.

SIGMA-ALDRICH. Increase Removal of Fat & Pigments From Avocado Prior to GC-MS Analysis of Pesticide and Metabolite Residues. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/food-beverage/avocado-extracts-zsep.html>. Acesso em: 14 jan. 2019.

SILBERGELD, E. K.; GRAHAM, J.; PRICE, L. B. **Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health**. Annual Review of Public Health, v. 29, p. 151–169, 2008.

SISCOMEX, Sistema Integrado de Comércio Exterior. Disponível em: http://aliceweb.mdic.gov.br/. Acesso em: 18/05/2017.

STECF. The Economic Performance of the EU Aquaculture SectorScientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (STECF), , 4 nov. 2013.

STOLKER, A. A. M.; BRINKMAN, U. A. T. **Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review**. Journal of Chromatography A, Mass Spectrometry: Innovation and Application. Part IV. v. 1067, n. 1–2, p. 15–53, 4 mar. 2005.

TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/equipe.php?ativo=equipe>. Acesso em: 16 mar. 2017.

TANG, Y. Y. et al. **Development of a Quantitative Multi-Class Method for 18 Antibiotics in Chicken, Pig, and Fish Muscle using UPLC-MS/MS**. Food Analytical Methods, v. 5, n. 6, p. 1459–1468, 2012.

TAO, Y. et al. **Determination of 17 macrolide antibiotics and avermectins residues in meat with accelerated solvent extraction by liquid chromatography–tandem mass spectrometry**. Journal of Chromatography B, v. 897, p. 64–71, 15 maio 2012.

TREVES-BROWN, K. M. Applied Fish Pharmacology. [s.l.] Kluwer Academic Publishers, 2000.

VENTURINI, C. D. et al. **Interações entre Antiparasitários e Alimentos**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 35, p. 17 – 23, 2014.

VSDB, Veterinary Substances DataBase. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/index.htm>. Acesso em: 6 mar. 2017.

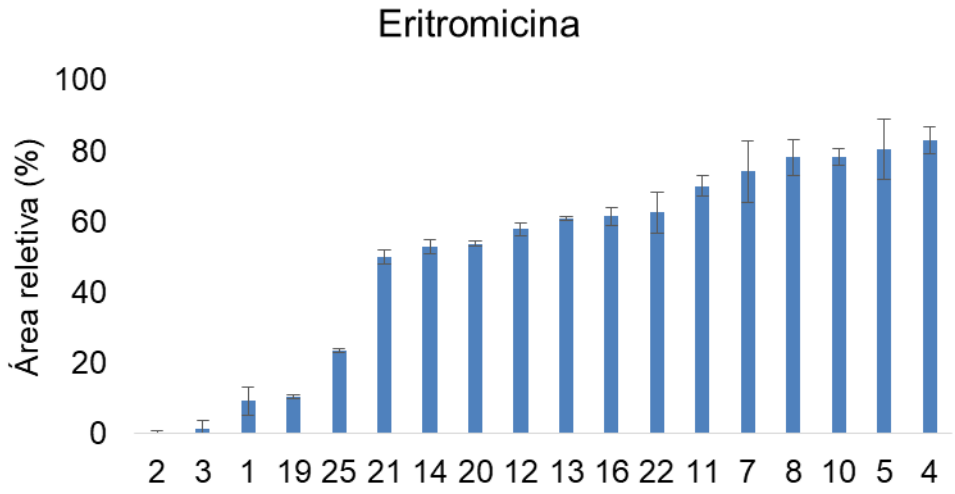
WATERS. Colunas ACQUITY UPLC: Waters. Disponível em: <http://waters.com/waters/pt_BR/ACQUITY-UPLC-Columns/nav.htm?locale=pt_BR&cid=513206>. Acesso em: 10 jan. 2019.

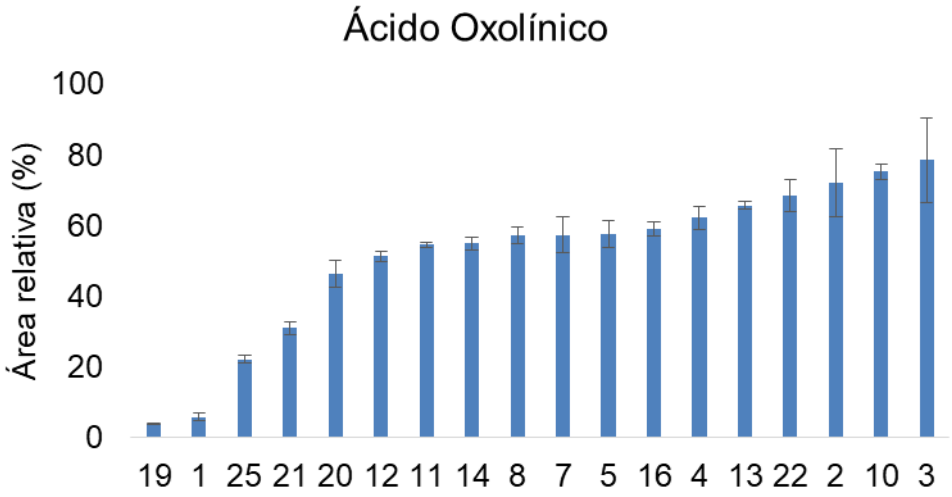
XU, N. et al. **Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method with modified QuEChERS extraction for the quantification of mebendazole and its metabolites, albendazole and its metabolites, and levamisole in edible tissues of aquatic animals**. Food Chemistry, v. 269, p. 442–449, 15 dez. 2018.

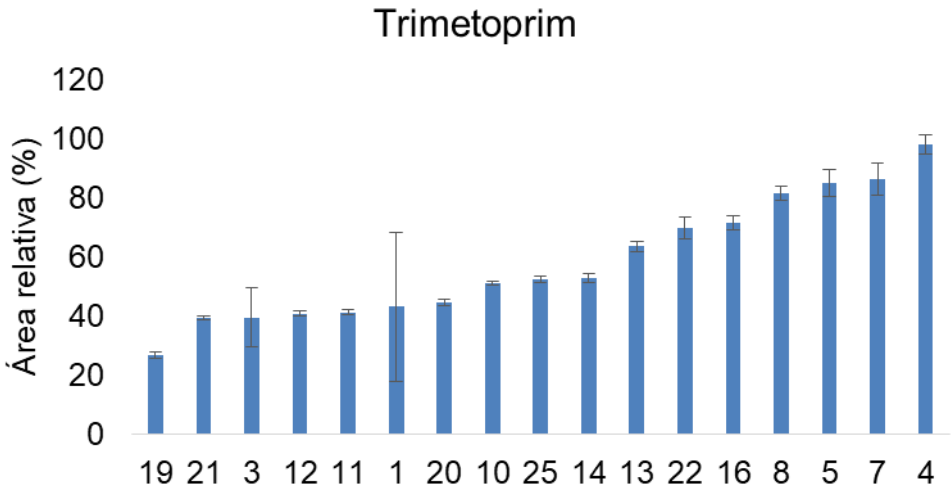
YIPEL, M. et al. **Determination of selected antibiotics in farmed fish species using LC-MS/MS**. 2016.

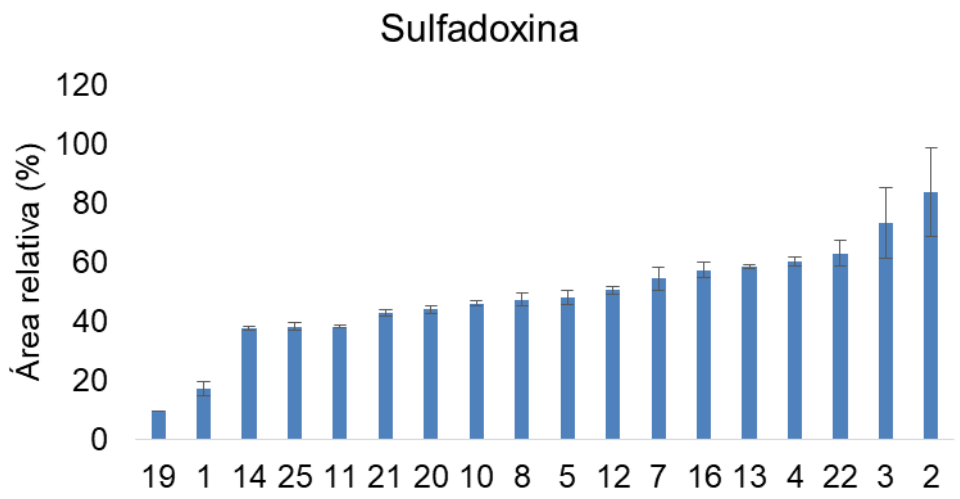
ZHANG, H. et al. **Simultaneous determination of quinolones in fish by liquid chromatography coupled with fluorescence detection: Comparison of sub-2 µm particles and conventional C18 columns**. Journal of Separation Science, v. 33, n. 13, p. 1959–1967, 2010.

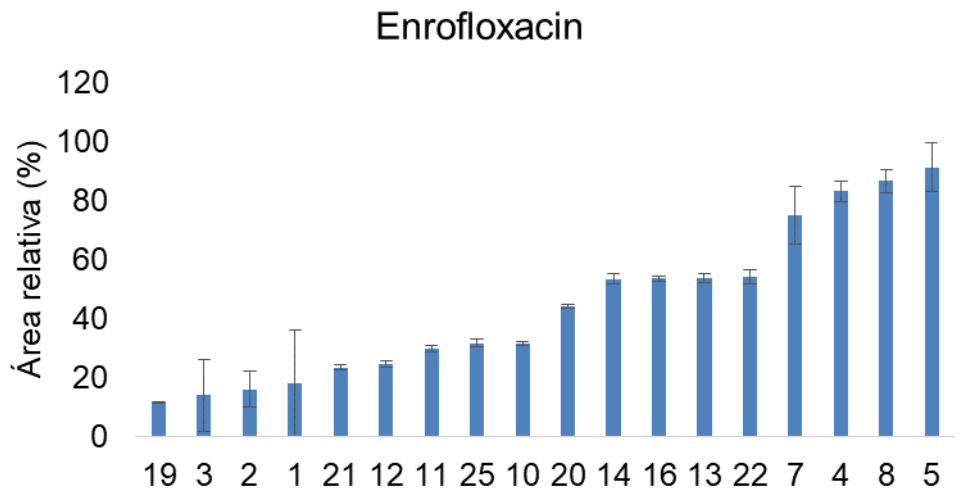
APÊNDICE – A Tabelas de comparação e resultados de área relativa (em função da área máxima obtida para a mesma solução 100 µg L^{-1}) sinal para cada um dos compostos em estudo em função da composição da fase móvel.

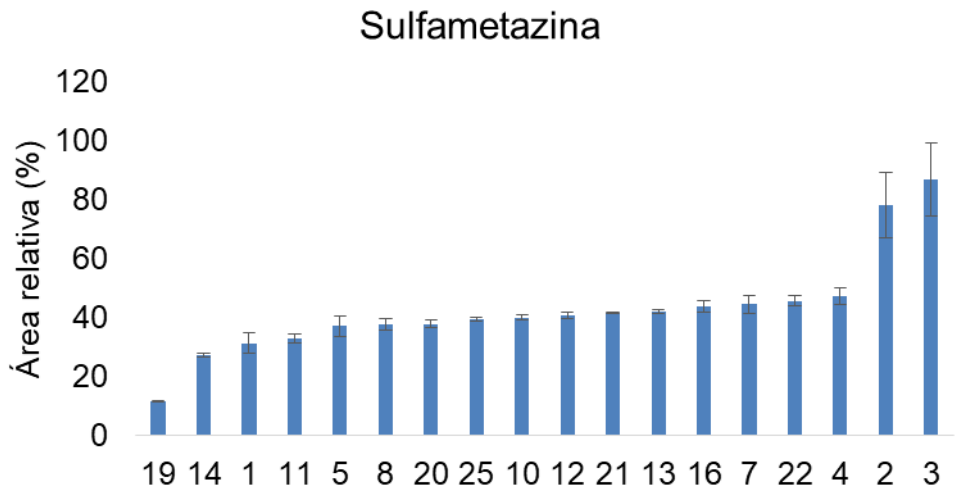


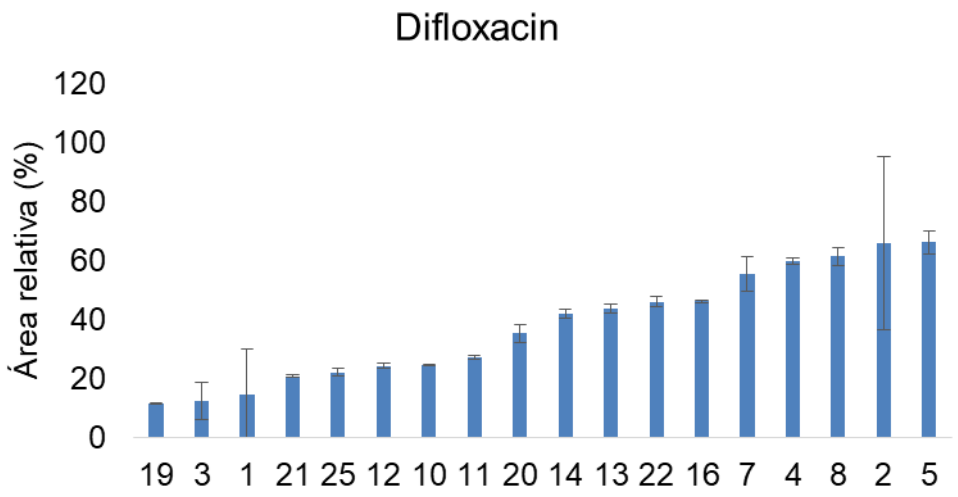


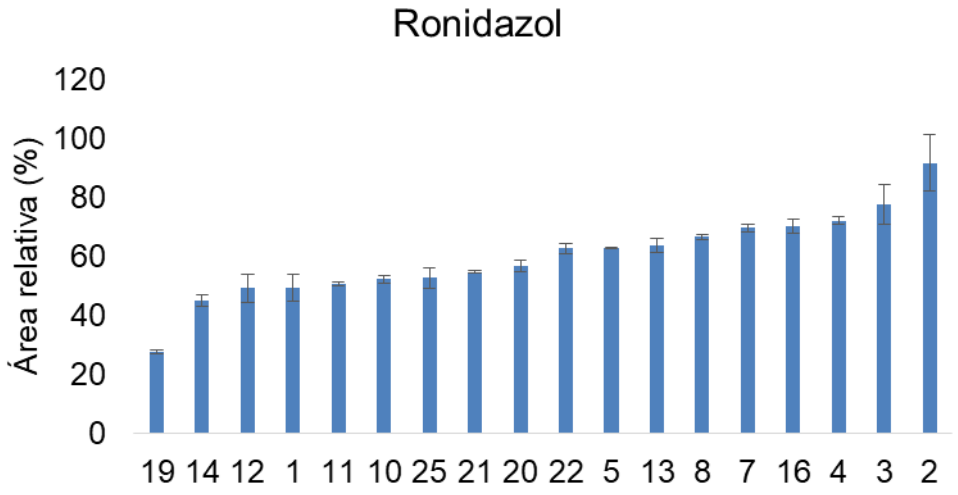


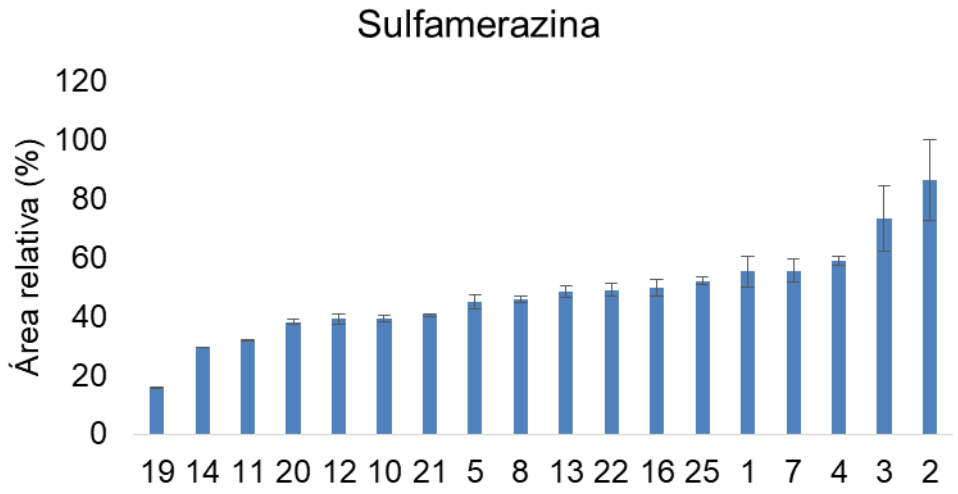

Sulfadoxina
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
19 1 14 25 11 21 20 10 8 5 12 7 16 13 4 22 3 2

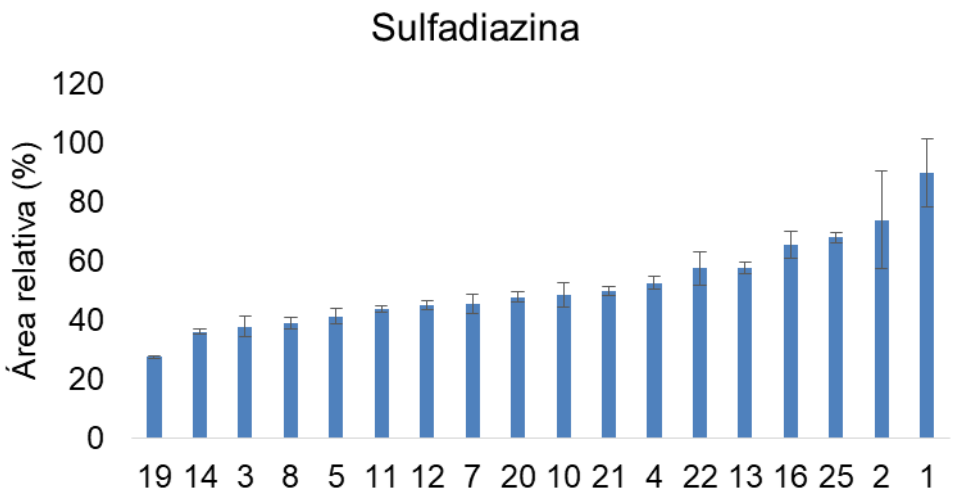

Enrofloxacin
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
19 3 2 1 21 12 11 25 10 20 14 16 13 22 7 4 8 5

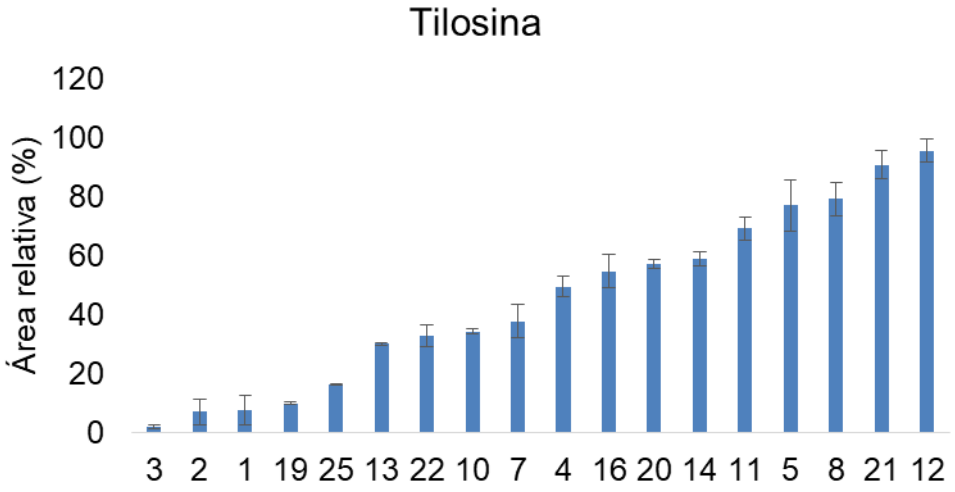

Sulfametazina
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
19 14 1 11 5 8 20 25 10 12 21 13 16 7 22 4 2 3

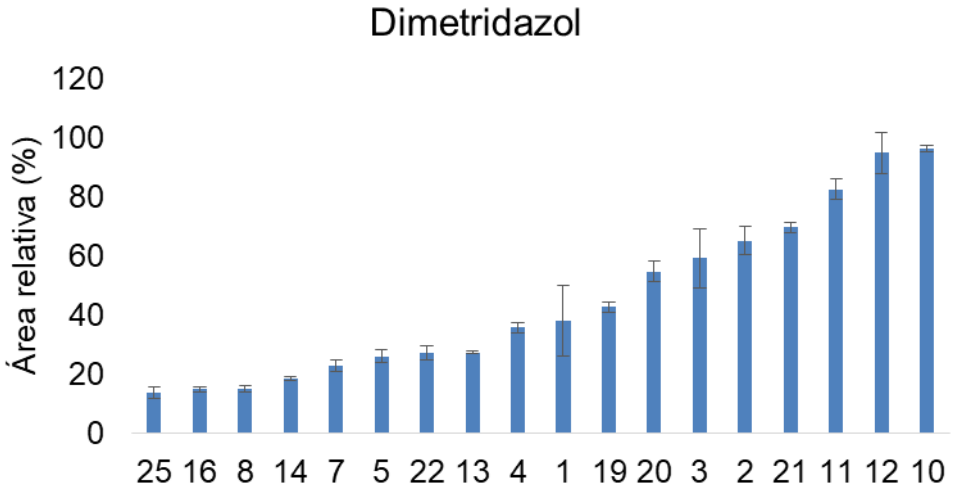

Difloxacin
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
19 3 1 21 25 12 10 11 20 14 13 22 16 7 4 8 2 5

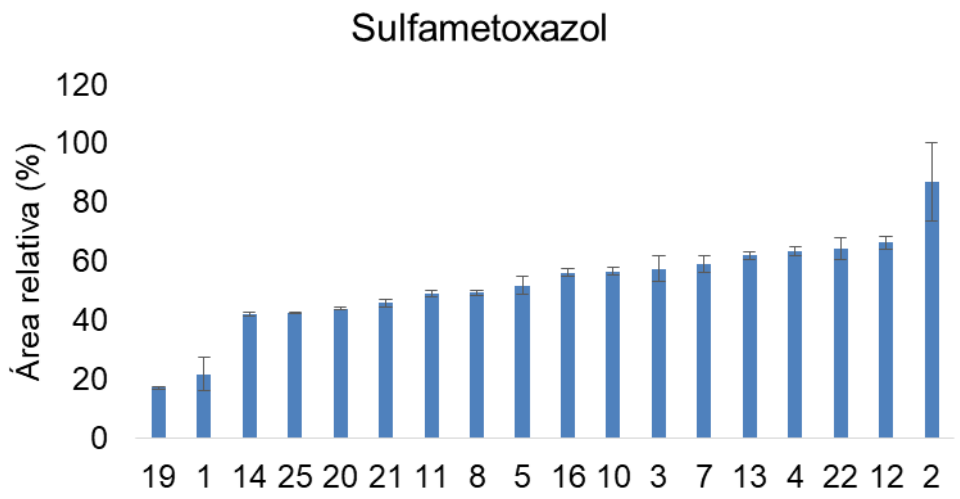

Ronidazol
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
19 14 12 1 11 10 25 21 20 22 5 13 8 7 16 4 3 2

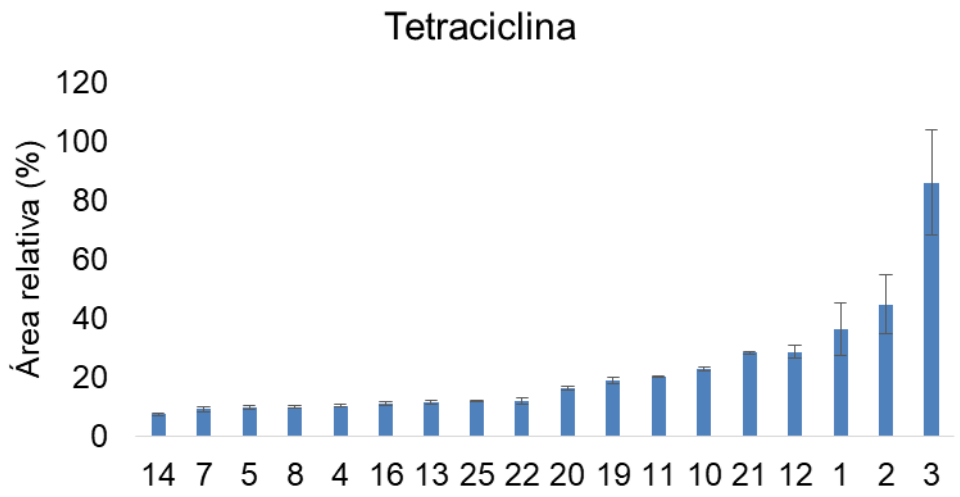

Sulfamerazina
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
19 14 11 20 12 10 21 5 8 13 22 16 25 1 7 4 3 2

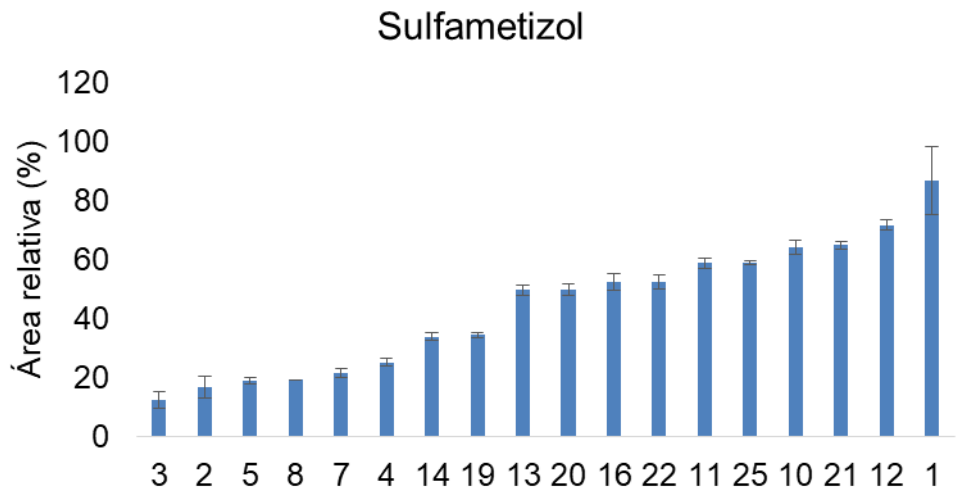

Sulfadiazina
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
19 14 3 8 5 11 12 7 20 10 21 4 22 13 16 25 2 1

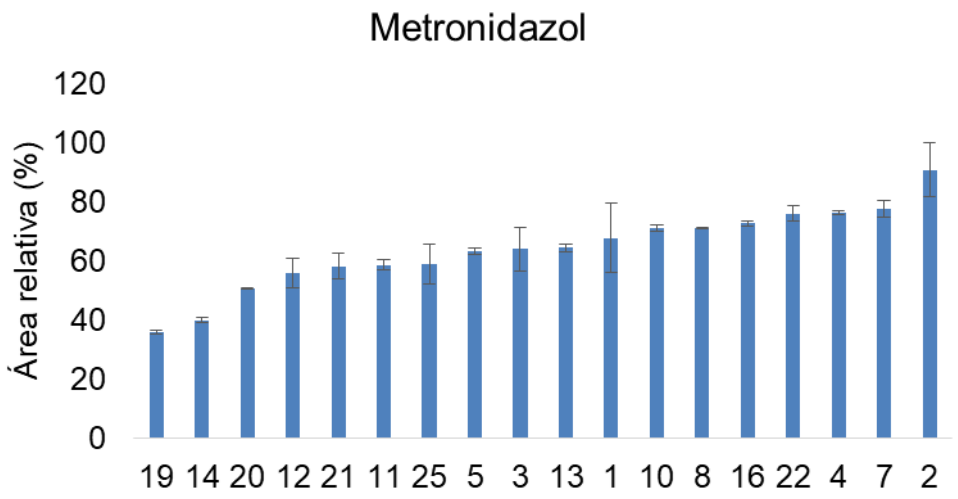

Tilosina
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
3 2 1 19 25 13 22 10 7 4 16 20 14 11 5 8 21 12

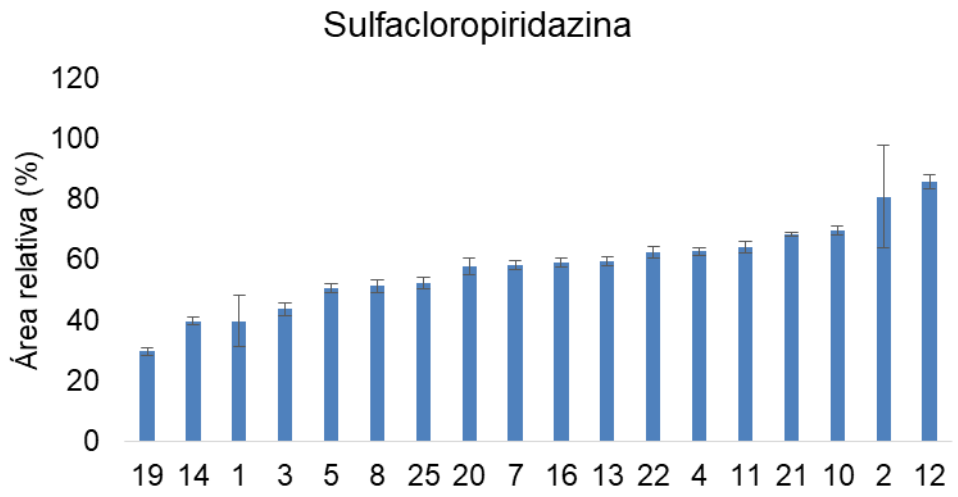

Dimetridazol
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
25 16 8 14 7 5 22 13 4 1 19 20 3 2 21 11 12 10

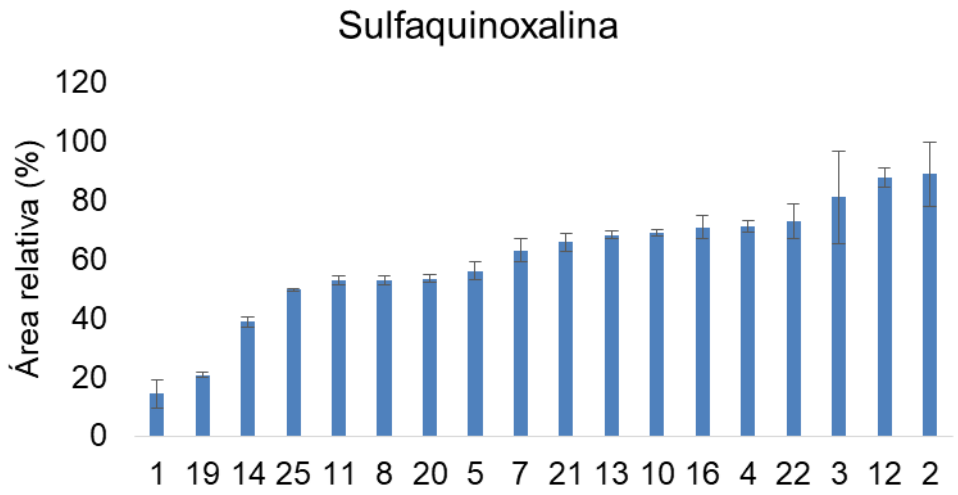

Sulfametoxazol
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
19 1 14 25 20 21 11 8 5 16 10 3 7 13 4 22 12 2

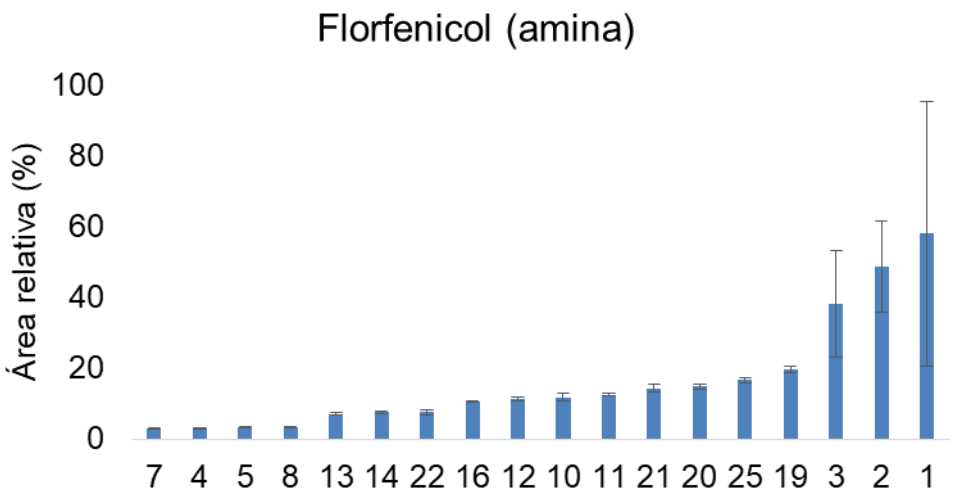

Tetraciclina
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
14 7 5 8 4 16 13 25 22 20 19 11 10 21 12 1 2 3

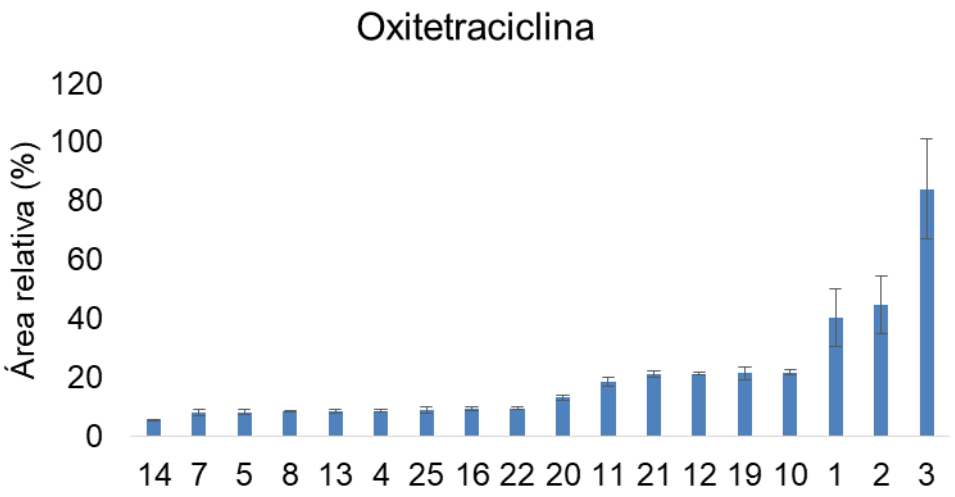

Sulfametizol
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
3 2 5 8 7 4 14 19 13 20 16 22 11 25 10 21 12 1

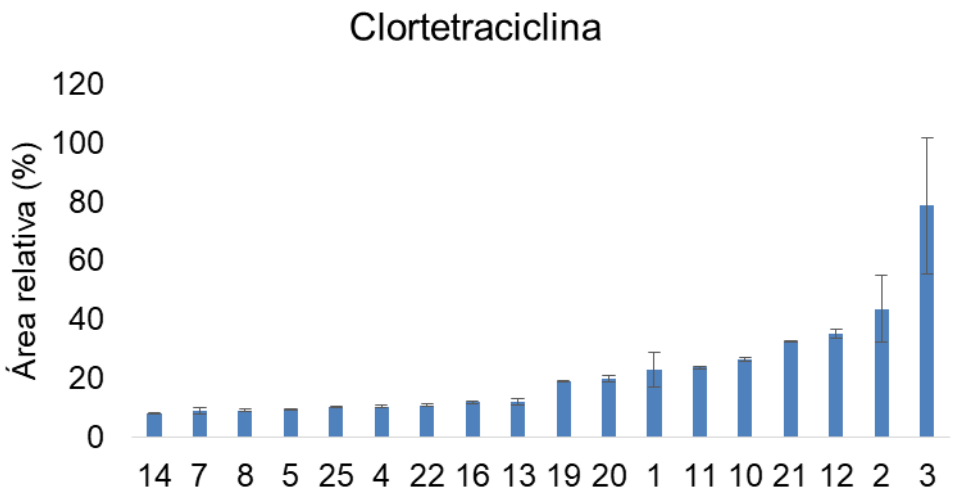

Metronidazol
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
19 14 20 12 21 11 25 5 3 13 1 10 8 16 22 4 7 2

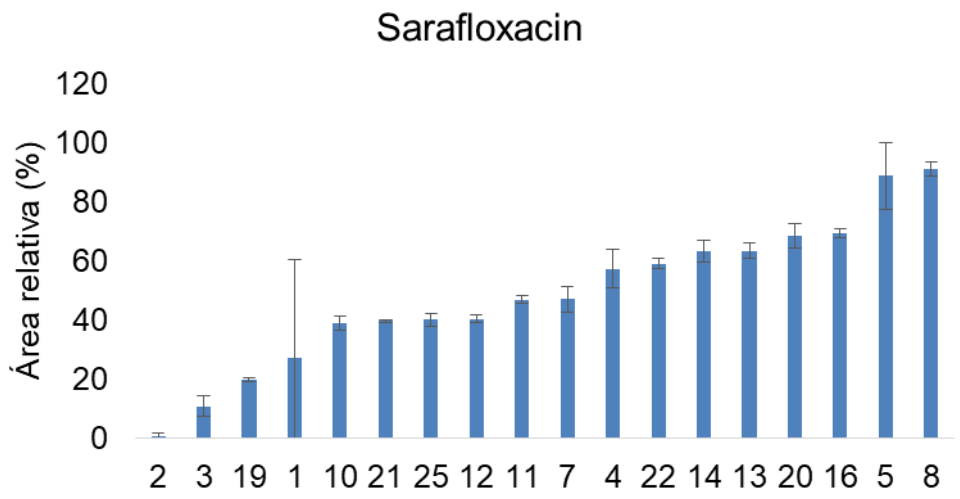

Sulfacloropiridazina
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
19 14 1 3 5 8 25 20 7 16 13 22 4 11 21 10 2 12

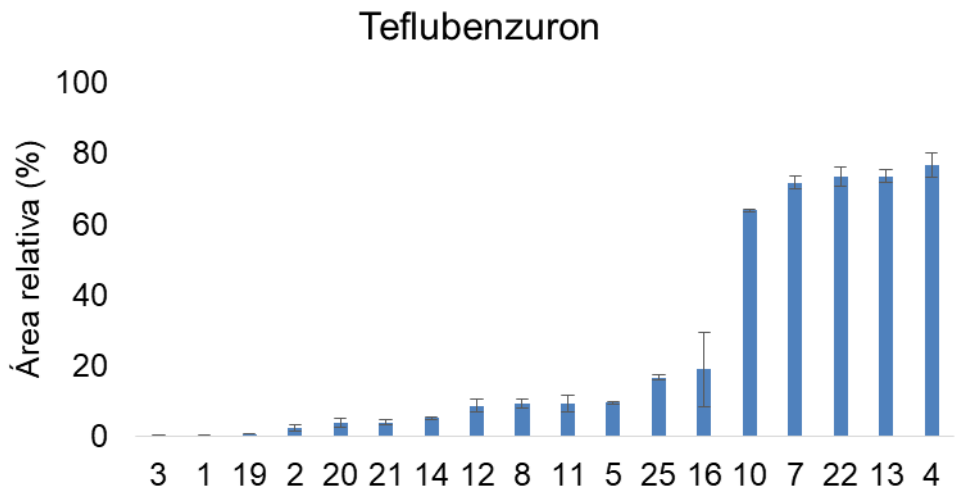

Sulfaquinoxalina
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
1 19 14 25 11 8 20 5 7 21 13 10 16 4 22 3 12 2

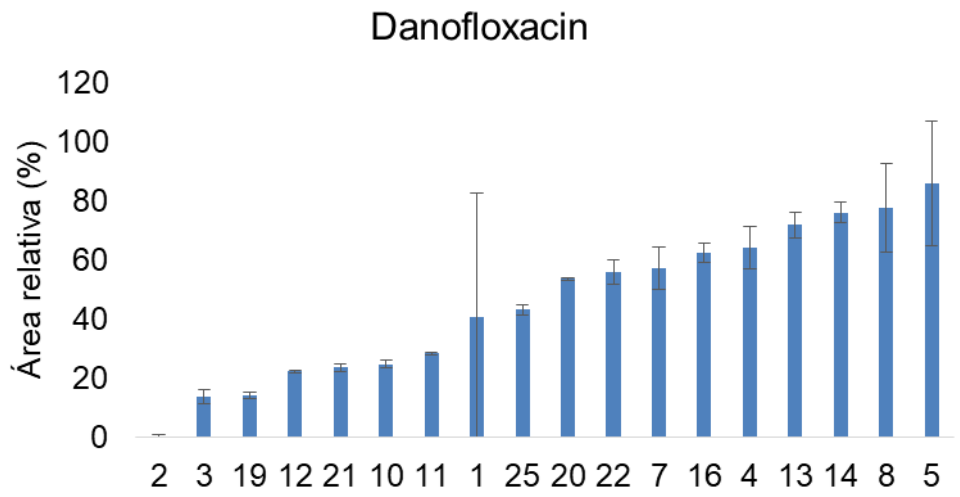

Florfenicol (amina)
Área relativa (%)
100
80
60
40
20
0
7 4 5 8 13 14 22 16 12 10 11 21 20 25 19 3 2 1

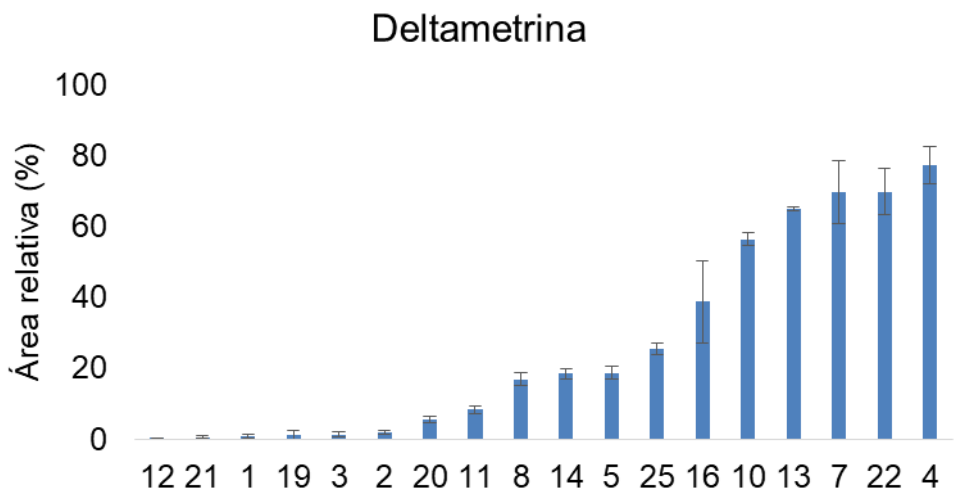

Oxitetraciclina
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
14 7 5 8 13 4 25 16 22 20 11 21 12 19 10 1 2 3

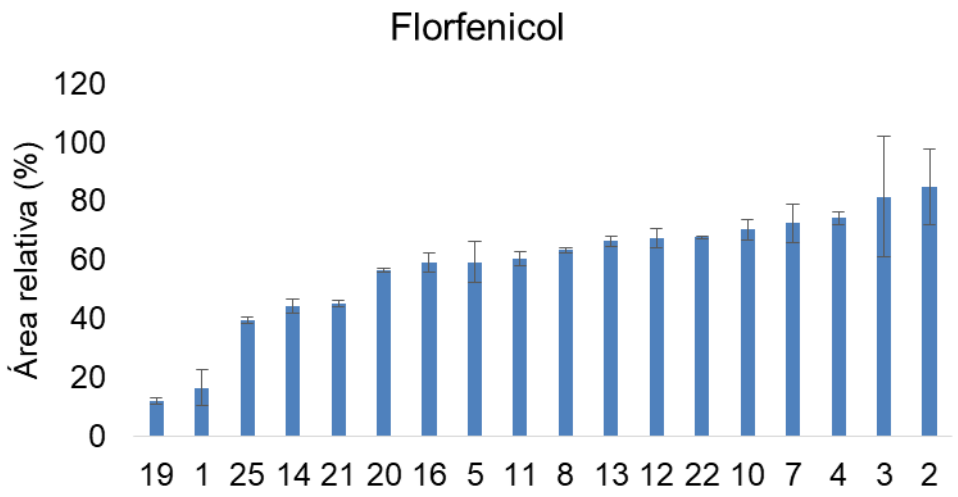

Clortetraciclina
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
14 7 8 5 25 4 22 16 13 19 20 1 11 10 21 12 2 3

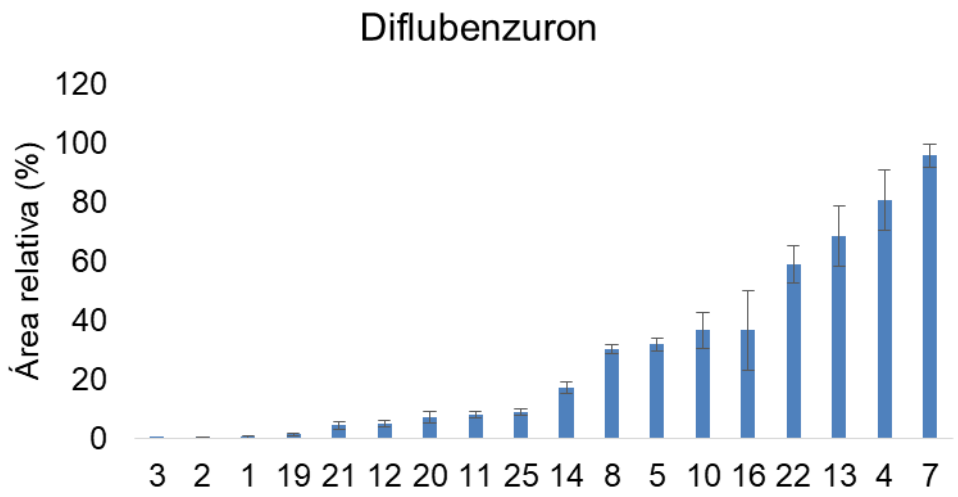

Sarafloxacin
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
2 3 19 1 10 21 25 12 11 7 4 22 14 13 20 16 5 8

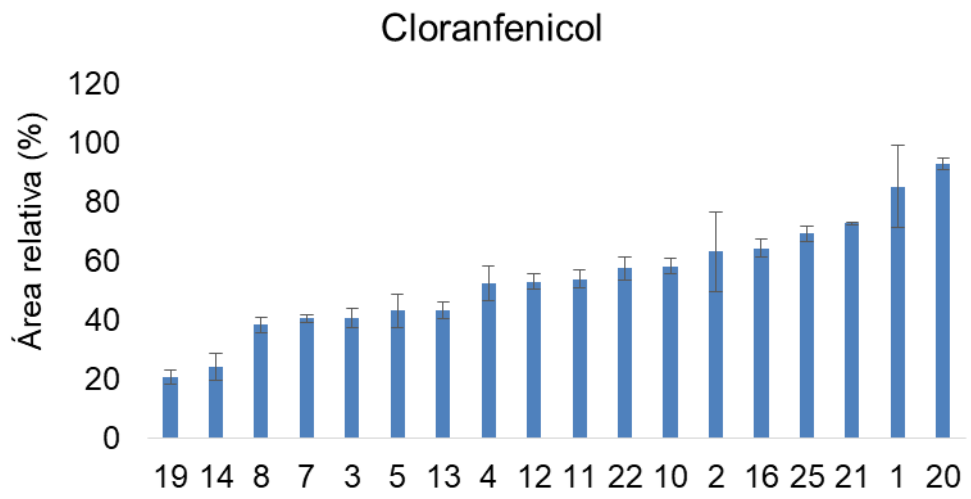

Teflubenzuron
Área relativa (%)
100
80
60
40
20
0
3 1 19 2 20 21 14 12 8 11 5 25 16 10 7 22 13 4

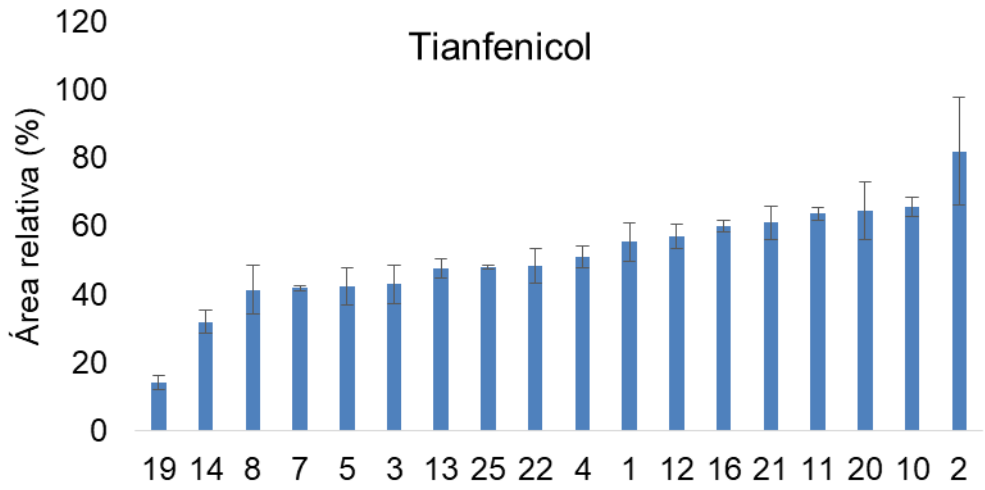

Danofloxacin
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
2 3 19 12 21 10 11 1 25 20 22 7 16 4 13 14 8 5


Deltametrina
Área relativa (%)
100
80
60
40
20
0
12 21 1 19 3 2 20 11 8 14 5 25 16 10 13 7 22 4


Florfenicol
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
19 1 25 14 21 20 16 5 11 8 13 12 22 10 7 4 3 2


Diflubenzuron
Área relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
3 2 1 19 21 12 20 11 25 14 8 5 10 16 22 13 4 7





Compostos	1ª	2ª	3ª
Tianfenicol	10	20	11
Cloranfenicol	20	21	25
Diflubenzuron	7	22	10
Florefenicol	4	7	10
Deltametrina	4	22	7
Danofloxacin	14	13	4
Teflubenzuron	4	13	22
Sarafloxacin	8	16	20
Clortetraciclina	12	21	10
Oxitetraciclina	10	19	12
Florefenicol (amina)	19	25	20
Sulfaquinoxalina	12	22	4
Sulfacloropiridazina	12	10	21
Metronidazol	2	7	4
Sulfametizol	12	21	10
Tetraciclina	12	21	10
Sulfametoxazol	12	22	4

Compostos	1ª	2ª	3ª
Dimetridazol	10	12	11
Tilosina	12	21	8
Sulfadizina	25	16	13
Sulfamerazina	4	7	1
Ronidazol	4	16	7
Difloxacin	5	8	4
Sulfametazina	4	22	7
Enrofloxacin	5	8	4
Sulfadoxina	22	4	13
Trimetoprim	4	7	5
Ácido Oxolínico	10	2	22
Eritromicina	4	5	10

Ensaios	Moda					SOMA	Fase Móvel A	Fase Móvel B	Formiato de Amônio	Ácido Fórmico
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª					
4	8	1	6	0	3	18	Água ultra pura	Metanol	12 mmol L-1	-
10	4	1	6	0	4	15	Água ultra pura	Metanol	-	0,1% (v,v)
7	1	4	3	3	3	14	Água ultra pura	Metanol	24 mmol L-1	-
16	0	3	0	5	5	13	Água ultra pura	Metanol	24 mmol L-1	0,1% (v,v)
22	1	5	2	3	1	12	Água ultra pura	Metanol	12 mmol L-1	0,2% (v,v)
13	0	2	2	4	3	11	Água ultra pura	Metanol	12 mmol L-1	0,1% (v,v)
12	7	1	1	0	1	10	Água ultra pura	Acetonitrila	-	0,1% (v,v)
21	0	5	1	4	0	10	Água ultra pura	Acetonitrila	-	0,2% (v,v)
11	0	0	2	3	4	9	Água ultra pura	Metanol/Acetonitrila 1:1 (v/v)	-	0,1% (v,v)
8	1	2	1	3	1	8	Água ultra pura	Metanol/Acetonitrila 1:1 (v/v)	24 mmol L-1	-
5	2	1	1	2	0	6	Água ultra pura	Metanol/Acetonitrila 1:1 (v/v)	12 mmol L-1	-
25	1	1	1	2	0	5	Água ultra pura	Metanol	24 mmol L-1	0,2% (v,v)
20	1	1	2	0	0	4	Água ultra pura	Metanol/Acetonitrila 1:1 (v/v)	-	0,2% (v,v)
2	1	1	0	0	1	3	Água ultra pura	Metanol/Acetonitrila 1:1 (v/v)	-	-
19	1	1	0	0	1	3	Água ultra pura	Metanol	-	0,2% (v,v)
1	0	0	1	0	1	2	Água ultra pura	Metanol	-	-
14	1	0	0	0	1	2	Água ultra pura	Metanol/Acetonitrila 1:1 (v/v)	12 mmol L-1	0,1% (v,v)

APÊNDICE C – Análise da variância das variáveis vazão da fase móvel, temperatura do gás de dessolvatação, tensão do capilar e suas interações lineares e quadráticas para os compostos em estudo (exceto para ronidazol, trimetoprim, florefenicol e oxitetraciclina)

Dimetridazol	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	8.370906E+12	1	8.370906E+12	8945.265	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	1.569069E+12	1	1.569069E+12	1676.729	0.000000
(3)Temperatura dessolvatação (L)	6.553413E+10	1	6.553413E+10	70.031	0.000000
1Q by 3L	4.117263E+10	1	4.117263E+10	43.998	0.000000
1L by 3L	2.411103E+10	1	2.411103E+10	25.765	0.000005
Temperatura dessolvatação (Q)	1.253373E+10	1	1.253373E+10	13.394	0.000575
1L by 3Q	1.094759E+10	1	1.094759E+10	11.699	0.001198
1L by 2L	9.050434E+09	1	9.050434E+09	9.671	0.002986
1Q by 3Q	8.838722E+09	1	8.838722E+09	9.445	0.003315
2Q by 3Q	2.565109E+09	1	2.565109E+09	2.741	0.103598
1Q by 2L	5.198030E+08	1	5.198030E+08	0.555	0.459324
2L by 3Q	4.224069E+08	1	4.224069E+08	0.451	0.504540
Tensão do capilar (Q)	2.558582E+08	1	2.558582E+08	0.273	0.603190
2L by 3L	1.878606E+08	1	1.878606E+08	0.201	0.655908
(2)Tensão do capilar (L)	1.675168E+08	1	1.675168E+08	0.179	0.673905
2Q by 3L	1.443468E+08	1	1.443468E+08	0.154	0.696052
1Q by 2Q	1.238499E+08	1	1.238499E+08	0.132	0.717431
1L by 2Q	1.176149E+06	1	1.176149E+06	0.001	0.971850
Lack of Fit	5.424067E+09	8	6.780084E+08	0.725	0.669113
Pure Error	5.053276E+10	54	9.357918E+08		
Total SS	9.564073E+12	80			

Metronidazol	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	5.395662E+11	1	5.395662E+11	1080.588	0.000000
(3)Temperatura dessolvatação (L)	1.493461E+11	1	1.493461E+11	299.095	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	7.138485E+10	1	7.138485E+10	142.962	0.000000
1L by 3Q	1.737700E+10	1	1.737700E+10	34.801	0.000000
1L by 2L	9.094793E+09	1	9.094793E+09	18.214	0.000080
1Q by 3L	7.622755E+09	1	7.622755E+09	15.266	0.000262
(2)Tensão do capilar (L)	4.631707E+09	1	4.631707E+09	9.276	0.003586
2L by 3L	2.670050E+09	1	2.670050E+09	5.347	0.024595
1Q by 2L	2.060891E+09	1	2.060891E+09	4.127	0.047129
Temperatura dessolvatação (Q)	1.351764E+09	1	1.351764E+09	2.707	0.105707
2Q by 3Q	1.267097E+09	1	1.267097E+09	2.538	0.117000
1L by 3L	8.782623E+08	1	8.782623E+08	1.759	0.190345
1L by 2Q	5.092959E+08	1	5.092959E+08	1.020	0.317031
1Q by 3Q	4.124322E+08	1	4.124322E+08	0.826	0.367477
Tensão do capilar (Q)	4.044060E+08	1	4.044060E+08	0.810	0.372145

2L by 3Q	2.218056E+08	1	2.218056E+08	0.444	0.507935
1Q by 2Q	1.376080E+08	1	1.376080E+08	0.276	0.601757
2Q by 3L	4.316166E+07	1	4.316166E+07	0.086	0.769880
Lack of Fit	8.333801E+09	8	1.041725E+09	2.086	0.053190
Pure Error	2.696363E+10	54	4.993265E+08		
Total SS	3.382036E+12	80			

Florefenicol (Amina)	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	1.139718E+09	1	1.139718E+09	392.7920	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	2.618387E+08	1	2.618387E+08	90.2400	0.000000
(3)Temperatura dessolvatação (L)	2.009422E+08	1	2.009422E+08	69.2527	0.000000
1L by 2L	6.547022E+07	1	6.547022E+07	22.5636	0.000015
1L by 3Q	3.652592E+07	1	3.652592E+07	12.5883	0.000812
1Q by 3Q	1.596654E+07	1	1.596654E+07	5.5027	0.022689
2L by 3L	1.417010E+07	1	1.417010E+07	4.8836	0.031373
1Q by 2L	4.780712E+06	1	4.780712E+06	1.6476	0.204764
2L by 3Q	3.478091E+06	1	3.478091E+06	1.1987	0.278443
1L by 2Q	2.120542E+06	1	2.120542E+06	0.7308	0.396394
2Q by 3L	1.410016E+06	1	1.410016E+06	0.4859	0.488731
Tensão do capilar (Q)	1.339538E+06	1	1.339538E+06	0.4617	0.499752
1L by 3L	1.321783E+06	1	1.321783E+06	0.4555	0.502596
1Q by 3L	7.390921E+05	1	7.390921E+05	0.2547	0.615824
Temperatura dessolvatação (Q)	6.662700E+05	1	6.662700E+05	0.2296	0.633738
2Q by 3Q	3.485040E+05	1	3.485040E+05	0.1201	0.730264
(2)Tensão do capilar (L)	1.520479E+05	1	1.520479E+05	0.0524	0.819800
1Q by 2Q	7.590430E+04	1	7.590430E+04	0.0262	0.872115
Lack of Fit	2.051941E+07	8	2.564926E+06	0.8840	0.536030
Pure Error	1.566854E+08	54	2.901581E+06		
Total SS	6.925516E+09	80			

Sulfadiazina	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	2.025223E+11	1	2.025223E+11	1221.225	0.000000
(3)Temperatura dessolvatação (L)	3.675044E+10	1	3.675044E+10	221.608	0.000000
1L by 3L	2.121249E+10	1	2.121249E+10	127.913	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	8.231452E+09	1	8.231452E+09	49.636	0.000000
1L by 3Q	4.900430E+09	1	4.900430E+09	29.550	0.000001
1L by 2L	3.445941E+09	1	3.445941E+09	20.779	0.000030
(2)Tensão do capilar (L)	1.290884E+09	1	1.290884E+09	7.784	0.007268
1Q by 2L	8.178007E+08	1	8.178007E+08	4.931	0.030589
2Q by 3Q	6.855396E+08	1	6.855396E+08	4.134	0.046961
Tensão do capilar (Q)	6.244401E+08	1	6.244401E+08	3.765	0.057551
2L by 3L	4.240271E+08	1	4.240271E+08	2.557	0.115648
2L by 3Q	3.604872E+08	1	3.604872E+08	2.174	0.146189
1Q by 2Q	2.200648E+08	1	2.200648E+08	1.327	0.254413

Temperatura dessolvatação (Q)	2.023985E+08	1	2.023985E+08	1.220	0.274165
1L by 2Q	1.059931E+08	1	1.059931E+08	0.639	0.427523
1Q by 3Q	4.461735E+07	1	4.461735E+07	0.269	0.606092
2Q by 3L	1.069991E+07	1	1.069991E+07	0.065	0.800452
1Q by 3L	7.699660E+06	1	7.699660E+06	0.046	0.830209
Lack of Fit	6.404924E+08	8	8.006155E+07	0.483	0.863085
Pure Error	8.955111E+09	54	1.658354E+08		
Total SS	1.114257E+12	80			

Sulfametoxazol	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	1.676745E+12	1	1.676745E+12	1641.449	0.000000
(3)Temperatura dessolvatação (L)	3.602764E+11	1	3.602764E+11	352.692	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	1.657798E+11	1	1.657798E+11	162.290	0.000000
1L by 3L	7.915596E+10	1	7.915596E+10	77.490	0.000000
1L by 3Q	2.557601E+10	1	2.557601E+10	25.038	0.000006
1L by 2L	1.522907E+10	1	1.522907E+10	14.908	0.000304
Temperatura dessolvatação (Q)	1.285467E+10	1	1.285467E+10	12.584	0.000814
2L by 3L	3.971824E+09	1	3.971824E+09	3.888	0.053758
(2)Tensão do capilar (L)	2.354103E+09	1	2.354103E+09	2.305	0.134829
1Q by 3Q	2.031050E+09	1	2.031050E+09	1.988	0.164253
2L by 3Q	1.744834E+09	1	1.744834E+09	1.708	0.196770
2Q by 3L	1.317939E+09	1	1.317939E+09	1.290	0.261028
1Q by 2L	8.772510E+08	1	8.772510E+08	0.859	0.358202
1Q by 3L	7.080383E+08	1	7.080383E+08	0.693	0.408768
1Q by 2Q	1.462357E+08	1	1.462357E+08	0.143	0.706646
1L by 2Q	1.132958E+08	1	1.132958E+08	0.111	0.740399
2Q by 3Q	9.318926E+07	1	9.318926E+07	0.091	0.763783
Tensão do capilar (Q)	1.284939E+07	1	1.284939E+07	0.013	0.911116
Lack of Fit	8.685051E+09	8	1.085631E+09	1.063	0.402602
Pure Error	5.516117E+10	54	1.021503E+09		
Total SS	9.929196E+12	80			

Ácido Oxolínico	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	1.108625E+13	1	1.108625E+13	597.0033	0.000000
(3)Temperatura dessolvatação (L)	5.365541E+12	1	5.365541E+12	288.9386	0.000000
1L by 3L	1.840131E+12	1	1.840131E+12	99.0925	0.000000
1L by 2L	2.141917E+11	1	2.141917E+11	11.5344	0.001288
1L by 3Q	1.768269E+11	1	1.768269E+11	9.5223	0.003199
1Q by 2L	1.234532E+11	1	1.234532E+11	6.6481	0.012686
Vazão da fase móvel (Q)	1.133367E+11	1	1.133367E+11	6.1033	0.016682
Temperatura dessolvatação (Q)	8.817968E+10	1	8.817968E+10	4.7485	0.033705
(2)Tensão do capilar (L)	8.209977E+10	1	8.209977E+10	4.4211	0.040173
2L by 3L	3.436775E+10	1	3.436775E+10	1.8507	0.179350
Tensão do capilar (Q)	2.830649E+10	1	2.830649E+10	1.5243	0.222312

1Q by 2Q	1.471588E+10	1	1.471588E+10	0.7925	0.377306
1L by 2Q	1.433850E+10	1	1.433850E+10	0.7721	0.383449
2Q by 3L	1.238599E+10	1	1.238599E+10	0.6670	0.417690
1Q by 3L	8.565824E+09	1	8.565824E+09	0.4613	0.499929
2Q by 3Q	2.611700E+09	1	2.611700E+09	0.1406	0.709112
1Q by 3Q	4.722916E+08	1	4.722916E+08	0.0254	0.873887
2L by 3Q	5.351755E+07	1	5.351755E+07	0.0029	0.957385
Lack of Fit	4.272564E+10	8	5.340705E+09	0.2876	0.967260
Pure Error	1.002771E+12	54	1.856983E+10		
Total SS	7.803877E+13	80			

Sulfamerazina	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	1.882003E+12	1	1.882003E+12	1254.140	0.000000
(3)Temperatura dessolvatação (L)	3.514425E+11	1	3.514425E+11	234.196	0.000000
1L by 3L	2.340671E+11	1	2.340671E+11	155.979	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	1.891318E+11	1	1.891318E+11	126.035	0.000000
1L by 3Q	2.704365E+10	1	2.704365E+10	18.022	0.000086
1L by 2L	1.511309E+10	1	1.511309E+10	10.071	0.002486
1Q by 3L	9.005058E+09	1	9.005058E+09	6.001	0.017573
(2)Tensão do capilar (L)	2.930832E+09	1	2.930832E+09	1.953	0.167972
Tensão do capilar (Q)	2.664324E+09	1	2.664324E+09	1.775	0.188303
1Q by 2L	2.612130E+09	1	2.612130E+09	1.741	0.192619
1Q by 3Q	2.467555E+09	1	2.467555E+09	1.644	0.205208
Temperatura dessolvatação (Q)	2.335272E+09	1	2.335272E+09	1.556	0.217607
2Q by 3Q	1.955163E+09	1	1.955163E+09	1.303	0.258722
2L by 3L	1.787516E+09	1	1.787516E+09	1.191	0.279938
2Q by 3L	1.748133E+09	1	1.748133E+09	1.165	0.285243
1Q by 2Q	7.512115E+08	1	7.512115E+08	0.501	0.482281
2L by 3Q	3.425603E+08	1	3.425603E+08	0.228	0.634733
1L by 2Q	1.384303E+07	1	1.384303E+07	0.009	0.923840
Lack of Fit	4.291089E+09	8	5.363862E+08	0.357	0.938173
Pure Error	8.103412E+10	54	1.500632E+09		
Total SS	1.137875E+13	80			

Sulfametizole	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	2.252552E+10	1	2.252552E+10	341.6985	0.000000
(3)Temperatura dessolvatação (L)	9.774004E+09	1	9.774004E+09	148.2658	0.000000
1L by 3L	1.487767E+09	1	1.487767E+09	22.5685	0.000015
Vazão da fase móvel (Q)	4.844121E+08	1	4.844121E+08	7.3482	0.008981
1L by 2L	4.507052E+08	1	4.507052E+08	6.8369	0.011549
Temperatura dessolvatação (Q)	3.780624E+08	1	3.780624E+08	5.7350	0.020130
2L by 3L	1.401936E+08	1	1.401936E+08	2.1267	0.150549
1L by 3Q	1.159515E+08	1	1.159515E+08	1.7589	0.190342
2Q by 3Q	1.126433E+08	1	1.126433E+08	1.7087	0.196689

1Q by 3L	1.064846E+08	1	1.064846E+08	1.6153	0.209195
1L by 2Q	8.848663E+07	1	8.848663E+07	1.3423	0.251729
2Q by 3L	8.261799E+07	1	8.261799E+07	1.2533	0.267885
2L by 3Q	5.287994E+07	1	5.287994E+07	0.8022	0.374424
1Q by 2L	3.293146E+07	1	3.293146E+07	0.4996	0.482737
Tensão do capilar (Q)	2.123245E+07	1	2.123245E+07	0.3221	0.572710
1Q by 2Q	7.370079E+06	1	7.370079E+06	0.1118	0.739400
1Q by 3Q	5.785946E+05	1	5.785946E+05	0.0088	0.925706
(2)Tensão do capilar (L)	4.647304E+02	1	4.647304E+02	0.0000	0.997891
Lack of Fit	3.926732E+08	8	4.908415E+07	0.7446	0.652050
Pure Error	3.559799E+09	54	6.592220E+07		
Total SS	1.536522E+11	80			

Sulfametazina	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	3.292205E+12	1	3.292205E+12	1080.280	0.000000
(3)Temperatura dessolvatação (L)	8.087827E+11	1	8.087827E+11	265.388	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	4.696561E+11	1	4.696561E+11	154.109	0.000000
1L by 3L	3.181164E+11	1	3.181164E+11	104.384	0.000000
1L by 3Q	4.090190E+10	1	4.090190E+10	13.421	0.000568
1L by 2L	2.571325E+10	1	2.571325E+10	8.437	0.005317
1Q by 3L	2.346653E+10	1	2.346653E+10	7.700	0.007569
Temperatura dessolvatação (Q)	1.989855E+10	1	1.989855E+10	6.529	0.013461
(2)Tensão do capilar (L)	1.919046E+10	1	1.919046E+10	6.297	0.015126
2L by 3Q	1.146624E+10	1	1.146624E+10	3.762	0.057647
1Q by 2L	9.391824E+09	1	9.391824E+09	3.082	0.084846
1Q by 3Q	6.559703E+09	1	6.559703E+09	2.152	0.148143
2L by 3L	4.444708E+09	1	4.444708E+09	1.458	0.232439
2Q by 3L	1.500755E+09	1	1.500755E+09	0.492	0.485852
1Q by 2Q	1.179151E+09	1	1.179151E+09	0.387	0.536542
2Q by 3Q	1.159846E+08	1	1.159846E+08	0.038	0.846058
1L by 2Q	1.990142E+07	1	1.990142E+07	0.007	0.935892
Tensão do capilar (Q)	1.908168E+06	1	1.908168E+06	0.001	0.980129
Lack of Fit	5.205039E+09	8	6.506299E+08	0.213	0.987191
Pure Error	1.645676E+11	54	3.047549E+09		
Total SS	2.162962E+13	80			

Sulfacloropiridazina	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	6.746523E+11	1	6.746523E+11	1186.601	0.000000
(3)Temperatura dessolvatação (L)	1.136541E+11	1	1.136541E+11	199.899	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	7.383035E+10	1	7.383035E+10	129.855	0.000000
1L by 3L	6.238956E+10	1	6.238956E+10	109.733	0.000000
1L by 3Q	9.044403E+09	1	9.044403E+09	15.908	0.000202
1L by 2L	6.061136E+09	1	6.061136E+09	10.661	0.001903
2L by 3L	3.818338E+09	1	3.818338E+09	6.716	0.012265

1Q by 2L	2.530705E+09	1	2.530705E+09	4.451	0.039529
Temperatura dessolvatação (Q)	1.534178E+09	1	1.534178E+09	2.698	0.106263
1Q by 3Q	1.479987E+09	1	1.479987E+09	2.603	0.112488
1Q by 3L	9.855638E+08	1	9.855638E+08	1.733	0.193533
(2)Tensão do capilar (L)	8.095685E+08	1	8.095685E+08	1.424	0.237980
1L by 2Q	5.266575E+08	1	5.266575E+08	0.926	0.340116
2Q by 3L	4.364747E+08	1	4.364747E+08	0.768	0.384815
2Q by 3Q	2.384397E+08	1	2.384397E+08	0.419	0.519993
2L by 3Q	7.928802E+07	1	7.928802E+07	0.139	0.710286
1Q by 2Q	1.936683E+07	1	1.936683E+07	0.034	0.854264
Tensão do capilar (Q)	6.994801E+05	1	6.994801E+05	0.001	0.972149
Lack of Fit	2.116666E+09	8	2.645833E+08	0.465	0.875035
Pure Error	3.070218E+10	54	5.685589E+08		
Total SS	3.843259E+12	80			

Sulfaquinoxalina	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	5.393931E+11	1	5.393931E+11	1745.699	0.000000
(3)Temperatura dessolvatação (L)	1.070595E+11	1	1.070595E+11	346.489	0.000000
1L by 3L	5.882472E+10	1	5.882472E+10	190.381	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	4.749499E+10	1	4.749499E+10	153.713	0.000000
1L by 2L	8.167379E+09	1	8.167379E+09	26.433	0.000004
1L by 3Q	6.408876E+09	1	6.408876E+09	20.742	0.000030
1Q by 2L	2.199509E+09	1	2.199509E+09	7.119	0.010051
Temperatura dessolvatação (Q)	1.909607E+09	1	1.909607E+09	6.180	0.016044
1Q by 3L	1.760993E+09	1	1.760993E+09	5.699	0.020502
(2)Tensão do capilar (L)	1.166951E+09	1	1.166951E+09	3.777	0.057190
2L by 3L	7.735139E+08	1	7.735139E+08	2.503	0.119440
1Q by 3Q	4.548382E+08	1	4.548382E+08	1.472	0.230304
1L by 2Q	1.642897E+08	1	1.642897E+08	0.532	0.469040
2L by 3Q	1.222271E+08	1	1.222271E+08	0.396	0.532034
2Q by 3L	1.024835E+08	1	1.024835E+08	0.332	0.567065
1Q by 2Q	5.935747E+07	1	5.935747E+07	0.192	0.662919
2Q by 3Q	4.524626E+07	1	4.524626E+07	0.146	0.703467
Tensão do capilar (Q)	1.669759E+05	1	1.669759E+05	0.001	0.981539
Lack of Fit	9.225851E+08	8	1.153231E+08	0.373	0.930238
Pure Error	1.668514E+10	54	3.089840E+08		
Total SS	3.210699E+12	80			

Sulfadoxina	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	1.130455E+13	1	1.130455E+13	1789.727	0.000000
(3)Temperatura dessolvatação (L)	2.823856E+12	1	2.823856E+12	447.071	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	1.276352E+12	1	1.276352E+12	202.071	0.000000
1L by 3L	9.759262E+11	1	9.759262E+11	154.508	0.000000
1L by 3Q	1.846071E+11	1	1.846071E+11	29.227	0.000001
1L by 2L	1.144685E+11	1	1.144685E+11	18.123	0.000083

(2)Tensão do capilar (L)	5.103872E+10	1	5.103872E+10	8.080	0.006303
1Q by 3L	4.005312E+10	1	4.005312E+10	6.341	0.014793
2L by 3L	3.941534E+10	1	3.941534E+10	6.240	0.015566
Temperatura dessolvatação (Q)	3.903917E+10	1	3.903917E+10	6.181	0.016041
1Q by 2L	2.920374E+10	1	2.920374E+10	4.624	0.036032
1Q by 3Q	1.621466E+10	1	1.621466E+10	2.567	0.114942
2L by 3Q	1.248818E+10	1	1.248818E+10	1.977	0.165423
Tensão do capilar (Q)	8.188498E+09	1	8.188498E+09	1.296	0.259899
1L by 2Q	7.831881E+09	1	7.831881E+09	1.240	0.270415
2Q by 3Q	5.741604E+09	1	5.741604E+09	0.909	0.344627
1Q by 2Q	2.691029E+09	1	2.691029E+09	0.426	0.516707
2Q by 3L	1.211670E+09	1	1.211670E+09	0.192	0.663144
Lack of Fit	3.784833E+10	8	4.731042E+09	0.749	0.648277
Pure Error	3.410831E+11	54	6.316353E+09		
Total SS	6.914938E+13	80			

Diflubenzuron	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	3.355444E+10	1	3.355444E+10	388.2649	0.000000
1L by 3L	1.596897E+10	1	1.596897E+10	184.7800	0.000000
1L by 3Q	7.604621E+09	1	7.604621E+09	87.9946	0.000000
1Q by 3L	2.771911E+09	1	2.771911E+09	32.0743	0.000001
(3)Temperatura dessolvatação (L)	1.489119E+09	1	1.489119E+09	17.2309	0.000118
Vazão da fase móvel (Q)	9.447898E+08	1	9.447898E+08	10.9323	0.001684
1Q by 3Q	8.927273E+08	1	8.927273E+08	10.3299	0.002210
Temperatura dessolvatação (Q)	7.777050E+08	1	7.777050E+08	8.9990	0.004081
1Q by 2Q	3.451797E+08	1	3.451797E+08	3.9941	0.050704
2Q by 3L	1.957551E+08	1	1.957551E+08	2.2651	0.138143
2L by 3L	1.845347E+08	1	1.845347E+08	2.1353	0.149738
2L by 3Q	1.739916E+08	1	1.739916E+08	2.0133	0.161673
2Q by 3Q	1.021725E+08	1	1.021725E+08	1.1823	0.281726
1L by 2Q	2.659004E+07	1	2.659004E+07	0.3077	0.581399
(2)Tensão do capilar (L)	2.258866E+07	1	2.258866E+07	0.2614	0.611259
1Q by 2L	2.037377E+07	1	2.037377E+07	0.2357	0.629258
Tensão do capilar (Q)	6.615417E+06	1	6.615417E+06	0.0765	0.783087
1L by 2L	3.610075E+06	1	3.610075E+06	0.0418	0.838822
Lack of Fit	1.248051E+09	8	1.560064E+08	1.8052	0.096239
Pure Error	4.666761E+09	54	8.642150E+07		
Total SS	1.365978E+11	80			

Danofloxacin	SS	df	MS	F	p
(3)Temperatura dessolvatação (L)	1.281141E+11	1	1.281141E+11	270.8991	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	3.477180E+10	1	3.477180E+10	73.5254	0.000000
1Q by 3L	2.597924E+10	1	2.597924E+10	54.9335	0.000000
1L by 3L	1.017846E+10	1	1.017846E+10	21.5225	0.000023

Temperatura dessolvatação (Q)	6.840220E+09	1	6.840220E+09	14.4637	0.000366
(1)Vazão da fase móvel (L)	5.068272E+09	1	5.068272E+09	10.7169	0.001855
(2)Tensão do capilar (L)	3.370312E+09	1	3.370312E+09	7.1266	0.010011
1L by 3Q	3.232840E+09	1	3.232840E+09	6.8359	0.011555
2L by 3L	2.298492E+09	1	2.298492E+09	4.8602	0.031764
1L by 2Q	8.181491E+08	1	8.181491E+08	1.7300	0.193970
1Q by 2Q	2.343349E+08	1	2.343349E+08	0.4955	0.484507
1Q by 2L	1.901100E+08	1	1.901100E+08	0.4020	0.528740
1Q by 3Q	1.793379E+08	1	1.793379E+08	0.3792	0.540612
2Q by 3Q	2.060600E+07	1	2.060600E+07	0.0436	0.835438
2L by 3Q	1.555433E+06	1	1.555433E+06	0.0033	0.954478
2Q by 3L	8.452339E+05	1	8.452339E+05	0.0018	0.966435
1L by 2L	7.177238E+05	1	7.177238E+05	0.0015	0.969068
Tensão do capilar (Q)	7.329220E+04	1	7.329220E+04	0.0002	0.990113
Lack of Fit	7.721993E+09	8	9.652491E+08	2.0410	0.058569
Pure Error	2.553779E+10	54	4.729220E+08		
Total SS	5.905389E+11	80			

Enrofloxacin	SS	df	MS	F	p
(3)Temperatura dessolvatação (L)	2.846613E+13	1	2.846613E+13	541.4345	0.000000
(1)Vazão da fase móvel (L)	1.974025E+13	1	1.974025E+13	375.4657	0.000000
Temperatura dessolvatação (Q)	1.812109E+12	1	1.812109E+12	34.4669	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	9.717297E+11	1	9.717297E+11	18.4826	0.000072
1L by 2L	7.930667E+11	1	7.930667E+11	15.0844	0.000283
1Q by 3L	2.931826E+11	1	2.931826E+11	5.5764	0.021841
1Q by 2L	1.803083E+11	1	1.803083E+11	3.4295	0.069511
2Q by 3Q	8.417887E+10	1	8.417887E+10	1.6011	0.211179
(2)Tensão do capilar (L)	2.269613E+10	1	2.269613E+10	0.4317	0.513953
1L by 2Q	2.124993E+10	1	2.124993E+10	0.4042	0.527624
1Q by 2Q	2.025929E+10	1	2.025929E+10	0.3853	0.537372
1L by 3Q	1.608914E+10	1	1.608914E+10	0.3060	0.582416
Tensão do capilar (Q)	6.885236E+09	1	6.885236E+09	0.1310	0.718852
2L by 3L	3.878996E+09	1	3.878996E+09	0.0738	0.786947
1L by 3L	3.150848E+09	1	3.150848E+09	0.0599	0.807534
2L by 3Q	1.600784E+09	1	1.600784E+09	0.0304	0.862132
2Q by 3L	3.284541E+07	1	3.284541E+07	0.0006	0.980151
1Q by 3Q	2.021734E+06	1	2.021734E+06	0.0000	0.995075
Lack of Fit	1.714062E+11	8	2.142578E+10	0.4075	0.911392
Pure Error	2.839071E+12	54	5.257538E+10		
Total SS	5.661527E+13	80			

Teflubenzuron	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	3.980331E+12	1	3.980331E+12	4705.873	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	3.033307E+11	1	3.033307E+11	358.622	0.000000

(3)Temperatura dessolvatação (L)	2.498445E+11	1	2.498445E+11	295.387	0.000000
1L by 3L	9.054899E+10	1	9.054899E+10	107.054	0.000000
Temperatura dessolvatação (Q)	1.744495E+10	1	1.744495E+10	20.625	0.000032
1L by 2Q	6.528994E+09	1	6.528994E+09	7.719	0.007500
1L by 2L	5.891932E+09	1	5.891932E+09	6.966	0.010835
1L by 3Q	5.145573E+09	1	5.145573E+09	6.084	0.016850
1Q by 2Q	4.721213E+09	1	4.721213E+09	5.582	0.021781
2Q by 3L	4.503122E+09	1	4.503122E+09	5.324	0.024895
1Q by 2L	4.437464E+09	1	4.437464E+09	5.246	0.025924
1Q by 3Q	4.106927E+09	1	4.106927E+09	4.856	0.031842
2L by 3L	3.826512E+09	1	3.826512E+09	4.524	0.038007
Tensão do capilar (Q)	3.245856E+09	1	3.245856E+09	3.838	0.055290
2L by 3Q	1.581734E+09	1	1.581734E+09	1.870	0.177134
2Q by 3Q	1.222226E+09	1	1.222226E+09	1.445	0.234574
1Q by 3L	1.055102E+09	1	1.055102E+09	1.247	0.268989
(2)Tensão do capilar (L)	8.791203E+08	1	8.791203E+08	1.039	0.312514
Lack of Fit	1.333231E+10	8	1.666538E+09	1.970	0.068048
Pure Error	4.567439E+10	54	8.458221E+08		
Total SS	4.595051E+12	80			

Sarafloxacin	SS	df	MS	F	p
(3)Temperatura dessolvatação (L)	4.020327E+11	1	4.020327E+11	562.4379	0.000000
(1)Vazão da fase móvel (L)	1.221266E+11	1	1.221266E+11	170.8533	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	3.062144E+10	1	3.062144E+10	42.8389	0.000000
Temperatura dessolvatação (Q)	1.429795E+10	1	1.429795E+10	20.0026	0.000040
1L by 2L	4.820963E+09	1	4.820963E+09	6.7445	0.012092
(2)Tensão do capilar (L)	2.731068E+09	1	2.731068E+09	3.8207	0.055808
1Q by 3L	2.675319E+09	1	2.675319E+09	3.7427	0.058284
1L by 2Q	2.216070E+09	1	2.216070E+09	3.1002	0.083942
1L by 3L	2.192619E+09	1	2.192619E+09	3.0674	0.085553
1Q by 2L	1.316560E+09	1	1.316560E+09	1.8418	0.180380
1Q by 3Q	1.077841E+09	1	1.077841E+09	1.5079	0.224788
Tensão do capilar (Q)	1.005569E+09	1	1.005569E+09	1.4068	0.240785
2Q by 3L	7.714589E+08	1	7.714589E+08	1.0793	0.303493
1L by 3Q	3.477372E+08	1	3.477372E+08	0.4865	0.488494
2L by 3Q	7.104564E+07	1	7.104564E+07	0.0994	0.753776
2Q by 3Q	1.218487E+07	1	1.218487E+07	0.0170	0.896607
2L by 3L	1.006612E+06	1	1.006612E+06	0.0014	0.970204
1Q by 2Q	3.724580E+05	1	3.724580E+05	0.0005	0.981873
Lack of Fit	6.410035E+09	8	8.012544E+08	1.1209	0.364299
Pure Error	3.859940E+10	54	7.148037E+08		
Total SS	6.438220E+11	80			

Difloxacin	SS	df	MS	F	p

(1)Vazão da fase móvel (L)	6.482198E+12	1	6.482198E+12	1014.778	0.000000
(3)Temperatura dessolvatação (L)	3.976332E+12	1	3.976332E+12	622.489	0.000000
Temperatura dessolvatação (Q)	5.918740E+11	1	5.918740E+11	92.657	0.000000
1L by 2L	1.402135E+11	1	1.402135E+11	21.950	0.000019
1Q by 3L	1.316493E+11	1	1.316493E+11	20.609	0.000032
1Q by 2L	3.242591E+10	1	3.242591E+10	5.076	0.028341
Vazão da fase móvel (Q)	3.046100E+10	1	3.046100E+10	4.769	0.033347
1L by 3L	1.506523E+10	1	1.506523E+10	2.358	0.130446
2L by 3Q	1.182777E+10	1	1.182777E+10	1.852	0.179248
1L by 3Q	9.735108E+09	1	9.735108E+09	1.524	0.222358
Tensão do capilar (Q)	7.103210E+09	1	7.103210E+09	1.112	0.296344
(2)Tensão do capilar (L)	5.340290E+09	1	5.340290E+09	0.836	0.364604
2L by 3L	4.327025E+09	1	4.327025E+09	0.677	0.414107
2Q by 3Q	2.733168E+09	1	2.733168E+09	0.428	0.515811
1L by 2Q	2.314452E+09	1	2.314452E+09	0.362	0.549738
1Q by 3Q	5.221622E+08	1	5.221622E+08	0.082	0.776042
2Q by 3L	1.353528E+08	1	1.353528E+08	0.021	0.884807
1Q by 2Q	1.030555E+08	1	1.030555E+08	0.016	0.899399
Lack of Fit	1.741735E+10	8	2.177169E+09	0.341	0.945989
Pure Error	3.449411E+11	54	6.387798E+09		
Total SS	1.192850E+13	80			

Tetraciclina	SS	df	MS	F	p
(3)Temperatura dessolvatação (L)	2.361431E+10	1	2.361431E+10	619.4547	0.000000
1L by 2L	1.581890E+09	1	1.581890E+09	41.4964	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	1.196025E+09	1	1.196025E+09	31.3743	0.000001
1L by 3L	6.000082E+08	1	6.000082E+08	15.7395	0.000216
Temperatura dessolvatação (Q)	4.457289E+08	1	4.457289E+08	11.6924	0.001201
2L by 3L	3.882054E+08	1	3.882054E+08	10.1835	0.002362
(1)Vazão da fase móvel (L)	2.738559E+08	1	2.738559E+08	7.1838	0.009733
(2)Tensão do capilar (L)	2.008245E+08	1	2.008245E+08	5.2681	0.025631
1Q by 3Q	1.044156E+08	1	1.044156E+08	2.7390	0.103725
1L by 3Q	9.976954E+07	1	9.976954E+07	2.6172	0.111540
1Q by 2Q	9.256775E+07	1	9.256775E+07	2.4283	0.125008
2L by 3Q	7.868994E+07	1	7.868994E+07	2.0642	0.156562
1Q by 3L	7.375581E+07	1	7.375581E+07	1.9348	0.169942
1Q by 2L	4.767013E+07	1	4.767013E+07	1.2505	0.268409
Tensão do capilar (Q)	1.535591E+07	1	1.535591E+07	0.4028	0.528317
2Q by 3Q	2.771632E+06	1	2.771632E+06	0.0727	0.788465
1L by 2Q	4.458909E+05	1	4.458909E+05	0.0117	0.914277
2Q by 3L	4.084442E+04	1	4.084442E+04	0.0011	0.974008
Lack of Fit	5.261474E+08	8	6.576842E+07	1.7252	0.113557
Pure Error	2.058541E+09	54	3.812113E+07		
Total SS	3.096761E+10	80			

Clortetraciclina	SS	df	MS	F	p
(3)Temperatura dessolvatação (L)	1.727386E+10	1	1.727386E+10	1144.009	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	1.626882E+10	1	1.626882E+10	1077.447	0.000000
(2)Tensão do capilar (L)	9.664831E+08	1	9.664831E+08	64.008	0.000000
1Q by 3L	8.916320E+08	1	8.916320E+08	59.051	0.000000
1L by 2L	5.723794E+08	1	5.723794E+08	37.907	0.000000
Temperatura dessolvatação (Q)	4.194807E+08	1	4.194807E+08	27.781	0.000002
1L by 3L	1.160494E+08	1	1.160494E+08	7.686	0.007622
2L by 3L	8.917732E+07	1	8.917732E+07	5.906	0.018443
1Q by 2Q	7.720256E+07	1	7.720256E+07	5.113	0.027799
1L by 3Q	4.010029E+07	1	4.010029E+07	2.656	0.108996
(1)Vazão da fase móvel (L)	3.122294E+07	1	3.122294E+07	2.068	0.156206
Tensão do capilar (Q)	2.999487E+07	1	2.999487E+07	1.986	0.164441
1Q by 2L	2.561912E+07	1	2.561912E+07	1.697	0.198249
2Q by 3Q	2.497295E+07	1	2.497295E+07	1.654	0.203916
1Q by 3Q	5.275378E+06	1	5.275378E+06	0.349	0.556933
2L by 3Q	4.716564E+06	1	4.716564E+06	0.312	0.578542
1L by 2Q	2.813589E+06	1	2.813589E+06	0.186	0.667701
2Q by 3L	5.659928E+03	1	5.659928E+03	0.000	0.984625
Lack of Fit	1.411905E+08	8	1.764881E+07	1.169	0.334790
Pure Error	8.153682E+08	54	1.509941E+07		
Total SS	3.807698E+10	80			

Deltametrina	SS	df	MS	F	p
(3)Temperatura dessolvatação (L)	7.641616E+10	1	7.641616E+10	178.9032	0.000000
(1)Vazão da fase móvel (L)	6.738990E+10	1	6.738990E+10	157.7712	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	3.208848E+10	1	3.208848E+10	75.1246	0.000000
Temperatura dessolvatação (Q)	5.099583E+09	1	5.099583E+09	11.9390	0.001832
1Q by 2L	1.898381E+09	1	1.898381E+09	4.4444	0.044437
1L by 2Q	1.574367E+09	1	1.574367E+09	3.6859	0.065499
1Q by 3L	1.560465E+09	1	1.560465E+09	3.6533	0.066627
Tensão do capilar (Q)	5.802804E+08	1	5.802804E+08	1.3585	0.253985
2L by 3Q	3.510579E+08	1	3.510579E+08	0.8219	0.372649
1Q by 2Q	3.057912E+08	1	3.057912E+08	0.7159	0.404926
2Q by 3L	3.029253E+08	1	3.029253E+08	0.7092	0.407108
2Q by 3Q	2.828785E+08	1	2.828785E+08	0.6623	0.422880
1L by 3L	2.044721E+08	1	2.044721E+08	0.4787	0.494917
1L by 2L	2.000395E+08	1	2.000395E+08	0.4683	0.499591
2L by 3L	1.490471E+08	1	1.490471E+08	0.3489	0.559624
1Q by 3Q	9.596087E+07	1	9.596087E+07	0.2247	0.639322
(2)Tensão do capilar (L)	4.526156E+07	1	4.526156E+07	0.1060	0.747295
1L by 3Q	6.267349E+05	1	6.267349E+05	0.0015	0.969726
Lack of Fit	2.584841E+09	8	3.231051E+08	0.7564	0.642771
Pure Error	1.153270E+10	27	4.271370E+08		
Total SS	2.137860E+11	53			

Eritromicina	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	1.106309E+14	1	1.106309E+14	1900.760	0.000000
(3)Temperatura dessolvatação (L)	6.605847E+13	1	6.605847E+13	1134.957	0.000000
Temperatura dessolvatação (Q)	2.987405E+12	1	2.987405E+12	51.327	0.000000
1L by 2L	1.609421E+12	1	1.609421E+12	27.652	0.000003
Vazão da fase móvel (Q)	1.127707E+12	1	1.127707E+12	19.375	0.000051
1L by 3L	1.032429E+12	1	1.032429E+12	17.738	0.000097
1L by 3Q	6.448223E+11	1	6.448223E+11	11.079	0.001578
1Q by 3L	5.659032E+11	1	5.659032E+11	9.723	0.002917
1Q by 2L	4.270099E+11	1	4.270099E+11	7.337	0.009032
1Q by 2Q	3.326836E+10	1	3.326836E+10	0.572	0.452915
1Q by 3Q	3.094985E+10	1	3.094985E+10	0.532	0.469022
2Q by 3L	2.534955E+10	1	2.534955E+10	0.436	0.512091
2L by 3L	1.989409E+10	1	1.989409E+10	0.342	0.561226
1L by 2Q	1.631719E+10	1	1.631719E+10	0.280	0.598644
2L by 3Q	1.198634E+10	1	1.198634E+10	0.206	0.651788
Tensão do capilar (Q)	1.140274E+10	1	1.140274E+10	0.196	0.659809
2Q by 3Q	5.298277E+09	1	5.298277E+09	0.091	0.764030
(2)Tensão do capilar (L)	2.684214E+08	1	2.684214E+08	0.005	0.946108
Lack of Fit	6.316725E+11	8	7.895906E+10	1.357	0.236624
Pure Error	3.142988E+12	54	5.820348E+10		
Total SS	1.895345E+14	80			

Tilosina	SS	df	MS	F	p
(3)Temperatura dessolvatação (L)	2.648302E+12	1	2.648302E+12	670.8361	0.000000
(1)Vazão da fase móvel (L)	1.351875E+12	1	1.351875E+12	342.4408	0.000000
Temperatura dessolvatação (Q)	8.905044E+10	1	8.905044E+10	22.5572	0.000015
1Q by 3L	6.924458E+10	1	6.924458E+10	17.5402	0.000105
1L by 2L	5.226563E+10	1	5.226563E+10	13.2393	0.000614
Vazão da fase móvel (Q)	3.472934E+10	1	3.472934E+10	8.7972	0.004486
(2)Tensão do capilar (L)	6.347954E+09	1	6.347954E+09	1.6080	0.210215
1L by 3L	5.241342E+09	1	5.241342E+09	1.3277	0.254295
1Q by 2L	5.093067E+09	1	5.093067E+09	1.2901	0.261043
2L by 3Q	3.505708E+09	1	3.505708E+09	0.8880	0.350210
Tensão do capilar (Q)	1.832869E+09	1	1.832869E+09	0.4643	0.498542
1L by 2Q	6.792844E+08	1	6.792844E+08	0.1721	0.679924
2Q by 3Q	5.203264E+08	1	5.203264E+08	0.1318	0.717987
2Q by 3L	4.202549E+08	1	4.202549E+08	0.1065	0.745479
1Q by 2Q	2.368346E+08	1	2.368346E+08	0.0600	0.807437
1Q by 3Q	1.037605E+08	1	1.037605E+08	0.0263	0.871815
2L by 3L	5.467440E+07	1	5.467440E+07	0.0138	0.906755
1L by 3Q	4.434743E+07	1	4.434743E+07	0.0112	0.915984
Lack of Fit	2.494216E+10	8	3.117770E+09	0.7898	0.613780

Pure Error	2.131792E+11	54	3.947764E+09
Total SS	4.590239E+12	80	

Cloranfenicol	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	410783355	1	410783355	2334.035	0.000000
(3)Temperatura dessolvatação (L)	136290041	1	136290041	774.388	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	16037250	1	16037250	91.122	0.000000
Temperatura dessolvatação (Q)	11252925	1	11252925	63.938	0.000000
1L by 3Q	5883542	1	5883542	33.430	0.000000
1Q by 2Q	935387	1	935387	5.315	0.025015
1Q by 3L	900282	1	900282	5.115	0.027765
1L by 2Q	743021	1	743021	4.222	0.044760
1Q by 3Q	652902	1	652902	3.710	0.059367
1L by 2L	571995	1	571995	3.250	0.077004
1L by 3L	421402	1	421402	2.394	0.127614
2Q by 3Q	399932	1	399932	2.272	0.137526
1Q by 2L	329522	1	329522	1.872	0.176876
2L by 3Q	213327	1	213327	1.212	0.275799
(2)Tensão do capilar (L)	41173	1	41173	0.234	0.630574
2Q by 3L	1227	1	1227	0.007	0.933763
Tensão do capilar (Q)	363	1	363	0.002	0.963929
2L by 3L	161	1	161	0.001	0.975994
Lack of Fit	1495196	8	186900	1.062	0.403169
Pure Error	9503841	54	175997		
Total SS	587319352	80			

Tianfenicol	SS	df	MS	F	p
(1)Vazão da fase móvel (L)	257800350	1	257800350	2989.807	0.000000
(3)Temperatura dessolvatação (L)	36938290	1	36938290	428.387	0.000000
Vazão da fase móvel (Q)	21092280	1	21092280	244.615	0.000000
1L by 3L	8753190	1	8753190	101.514	0.000000
Temperatura dessolvatação (Q)	723776	1	723776	8.394	0.005428
1L by 3Q	629402	1	629402	7.299	0.009198
2Q by 3Q	303449	1	303449	3.519	0.066071
1L by 2Q	233110	1	233110	2.703	0.105941
(2)Tensão do capilar (L)	226597	1	226597	2.628	0.110824
1Q by 3L	93293	1	93293	1.082	0.302895
2L by 3Q	86733	1	86733	1.006	0.320367
1Q by 3Q	75698	1	75698	0.878	0.352949
1L by 2L	44155	1	44155	0.512	0.477321
2Q by 3L	19304	1	19304	0.224	0.638006
1Q by 2L	10046	1	10046	0.117	0.734180
2L by 3L	4344	1	4344	0.050	0.823257
Tensão do capilar (Q)	180	1	180	0.002	0.963772
1Q by 2Q	0	1	0	0.000	0.998607

Lack of Fit	517426	8	64678	0.750	0.647356
Pure Error	4656226	54	86226		
Total SS	323182745	80			

APÊNDICE D – Análise da variância das variáveis percentagem de TCA e concentração de EDTA adicionados na etapa de extração e suas interações lineares e quadráticas para os compostos em estudo.

Dimetridazol	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	35877078	1	35877078	12.48816	0.002371
TCA (Q)	45856556	1	45856556	15.96184	0.000849
(2)EDTA (L)	2785713	1	2785713	0.96966	0.337818
EDTA (Q)	646986	1	646986	0.22520	0.640809
1L by 2L	11764677	1	11764677	4.09507	0.058114
1L by 2Q	10939664	1	10939664	3.80790	0.066751
1Q by 2L	4767367	1	4767367	1.65943	0.213994
1Q by 2Q	6536555	1	6536555	2.27526	0.148805
Error	51711969	18	2872887		
Total SS	169677118	26			

Metronidazol	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	128288606	1	128288606	13.90926	0.001534
TCA (Q)	170899273	1	170899273	18.52917	0.000427
(2)EDTA (L)	90309366	1	90309366	9.79149	0.005798
EDTA (Q)	13290023	1	13290023	1.44093	0.245550
1L by 2L	76434121	1	76434121	8.28711	0.009994
1L by 2Q	35156741	1	35156741	3.81175	0.066626
1Q by 2L	28178308	1	28178308	3.05514	0.097519
1Q by 2Q	9265909	1	9265909	1.00462	0.329479
Error	166018577	18	9223254		
Total SS	718533770	26			

Ronidazol	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	2.806848E+08	1	280684825	17.86529	0.000507
TCA (Q)	1.712122E+08	1	171212183	10.89748	0.003971
(2)EDTA (L)	1.279601E+08	1	127960098	8.14453	0.010544
EDTA (Q)	1.161543E+07	1	11615434	0.73931	0.401189
1L by 2L	8.234081E+07	1	82340813	5.24091	0.034364
1L by 2Q	8.609651E+07	1	86096514	5.47995	0.030947
1Q by 2L	8.235783E+07	1	82357835	5.24199	0.034347
1Q by 2Q	9.304015E+07	1	93040151	5.92191	0.025601
Error	2.828012E+08	18	15711178		
Total SS	1.220667E+09	26			

Sulfadiazina	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	3.515743E+08	1	351574338	7.427702	0.013882
TCA (Q)	4.425136E+08	1	442513640	9.348974	0.006779
(2)EDTA (L)	1.279598E+08	1	127959758	2.703402	0.117486
EDTA (Q)	5.227073E+06	1	5227073	0.110432	0.743491
1L by 2L	1.926549E+08	1	192654861	4.070214	0.058808
1L by 2Q	2.331956E+08	1	233195576	4.926717	0.039530
1Q by 2L	1.454908E+08	1	145490834	3.073781	0.096578
1Q by 2Q	8.475854E+07	1	84758543	1.790692	0.197502
Error	8.519914E+08	18	47332856		
Total SS	2.449113E+09	26			

Sulfametoxazol	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	5.206267E+07	1	52062672	1.71934	0.206259
TCA (Q)	4.025403E+08	1	402540299	13.29366	0.001848
(2)EDTA (L)	1.147556E+08	1	114755630	3.78974	0.067346
EDTA (Q)	2.938354E+07	1	29383542	0.97037	0.337644
1L by 2L	1.847585E+08	1	184758464	6.10154	0.023734
1L by 2Q	1.594984E+08	1	159498383	5.26734	0.033965
1Q by 2L	3.846907E+07	1	38469072	1.27042	0.274490
1Q by 2Q	1.637842E+08	1	163784239	5.40888	0.031921
Error	5.450511E+08	18	30280617		
Total SS	1.697983E+09	26			

Ácido Oxolínico	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	3.402651E+08	1	3.402651E+08	1.071792	0.314250
TCA (Q)	1.614585E+09	1	1.614585E+09	5.085738	0.036812
(2)EDTA (L)	5.386403E+08	1	5.386403E+08	1.696649	0.209147
EDTA (Q)	3.103711E+08	1	3.103711E+08	0.977630	0.335891
1L by 2L	5.466104E+08	1	5.466104E+08	1.721753	0.205955
1L by 2Q	1.872271E+09	1	1.872271E+09	5.897416	0.025868
1Q by 2L	2.681675E+08	1	2.681675E+08	0.844693	0.370211
1Q by 2Q	6.172822E+08	1	6.172822E+08	1.944361	0.180169
Error	5.714516E+09	18	3.174731E+08		
Total SS	1.178574E+10	26			

Sulfamerazina	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	1.804630E+08	1	180462971	8.30440	0.009929
TCA (Q)	5.150614E+08	1	515061367	23.70167	0.000124
(2)EDTA (L)	1.577938E+08	1	157793813	7.26123	0.014819
EDTA (Q)	2.438233E+07	1	24382331	1.12201	0.303495
1L by 2L	6.385746E+07	1	63857456	2.93854	0.103656

1L by 2Q	4.990191E+06	1	4990191	0.22963	0.637565
1Q by 2L	6.096394E+07	1	60963935	2.80539	0.111233
1Q by 2Q	4.294773E+07	1	42947734	1.97633	0.176804
Error	3.911583E+08	18	21731017		
Total SS	1.432336E+09	26			

Sulfametizole	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	3.479040E+07	1	34790398	0.72097	0.406977
TCA (Q)	5.636380E+08	1	563638046	11.68040	0.003069
(2)EDTA (L)	7.839026E+07	1	78390265	1.62450	0.218674
EDTA (Q)	4.332182E+07	1	43321824	0.89777	0.355929
1L by 2L	1.818737E+08	1	181873688	3.76901	0.068032
1L by 2Q	2.169239E+08	1	216923902	4.49536	0.048141
1Q by 2L	1.518080E+08	1	151807968	3.14595	0.093034
1Q by 2Q	9.284150E+07	1	92841499	1.92398	0.182356
Error	8.685903E+08	18	48255015		
Total SS	2.250459E+09	26			

Sulfametazina	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	8.434489E+07	1	84344887	1.603091	0.221607
TCA (Q)	5.119263E+08	1	511926343	9.729868	0.005924
(2)EDTA (L)	2.196854E+08	1	219685376	4.175425	0.055934
EDTA (Q)	4.472529E+07	1	44725292	0.850066	0.368727
1L by 2L	1.728195E+08	1	172819488	3.284673	0.086645
1L by 2Q	2.019115E+08	1	201911519	3.837608	0.065792
1Q by 2L	1.468661E+08	1	146866073	2.791393	0.112068
1Q by 2Q	3.268416E+08	1	326841622	6.212077	0.022663
Error	9.470502E+08	18	52613902		
Total SS	2.669118E+09	26			

Sulfacloropiridazina	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	9.518872E+06	1	9518872	0.32710	0.574448
TCA (Q)	4.439704E+08	1	443970431	15.25607	0.001036
(2)EDTA (L)	3.349016E+07	1	33490156	1.15082	0.297551
EDTA (Q)	2.480768E+07	1	24807680	0.85246	0.368069
1L by 2L	1.478701E+08	1	147870145	5.08123	0.036886
1L by 2Q	1.643709E+08	1	164370925	5.64825	0.028774
1Q by 2L	5.117634E+07	1	51176343	1.75856	0.201386
1Q by 2Q	6.370778E+07	1	63707782	2.18918	0.156273
Error	5.238221E+08	18	29101227		
Total SS	1.476119E+09	26			

Trimetoprim	SS	df	MS	F	p

(1)TCA (L)	4.918729E+08	1	491872857	21.74938	0.000193
TCA (Q)	3.930420E+08	1	393042027	17.37933	0.000577
(2)EDTA (L)	1.240120E+08	1	124011963	5.48350	0.030899
EDTA (Q)	1.127555E+05	1	112756	0.00499	0.944487
1L by 2L	1.454163E+08	1	145416331	6.42994	0.020708
1L by 2Q	1.125467E+08	1	112546714	4.97653	0.038654
1Q by 2L	2.189927E+07	1	21899273	0.96833	0.338140
1Q by 2Q	2.117292E+08	1	211729215	9.36213	0.006747
Error	4.070789E+08	18	22615493		
Total SS	1.903099E+09	26			

Sulfaquinoxalina	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	681	1	681	0.000024	0.996163
TCA (Q)	168957236	1	168957236	5.895800	0.025886
(2)EDTA (L)	11481167	1	11481167	0.400638	0.534720
EDTA (Q)	30889253	1	30889253	1.077887	0.312917
1L by 2L	19818270	1	19818270	0.691563	0.416529
1L by 2Q	67727985	1	67727985	2.363383	0.141605
1Q by 2L	7379331	1	7379331	0.257503	0.618002
1Q by 2Q	59876360	1	59876360	2.089399	0.165511
Error	515829968	18	28657220		
Total SS	879623938	26			

Sulfadoxina	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	2.584504E+07	1	25845042	0.676330	0.421614
TCA (Q)	2.190397E+08	1	219039737	5.731979	0.027758
(2)EDTA (L)	2.651532E+07	1	26515316	0.693871	0.415767
EDTA (Q)	2.020298E+07	1	20202976	0.528685	0.476511
1L by 2L	7.472781E+07	1	74727807	1.955527	0.178985
1L by 2Q	1.315062E+08	1	131506166	3.441342	0.080038
1Q by 2L	3.392571E+07	1	33925710	0.887791	0.358552
1Q by 2Q	9.458092E+07	1	94580918	2.475057	0.133077
Error	6.878454E+08	18	38213634		
Total SS	1.315132E+09	26			

Florfenicol	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	1553221	1	1553221	1.11116	0.305775
TCA (Q)	11792180	1	11792180	8.43599	0.009454
(2)EDTA (L)	1539452	1	1539452	1.10131	0.307866
EDTA (Q)	572485	1	572485	0.40955	0.530260

1L by 2L	12390955	1	12390955	8.86435	0.008074
1L by 2Q	15941845	1	15941845	11.40461	0.003358
1Q by 2L	5017421	1	5017421	3.58941	0.074330
1Q by 2Q	41605	1	41605	0.02976	0.864952
Error	25161154	18	1397842		
Total SS	75626361	26			

Enrofloxacin	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	5.462002E+08	1	546200151	31.04486	0.000027
TCA (Q)	3.994133E+08	1	399413312	22.70181	0.000155
(2)EDTA (L)	1.520632E+08	1	152063237	8.64295	0.008756
EDTA (Q)	3.591784E+05	1	359178	0.02041	0.887972
1L by 2L	1.581419E+08	1	158141880	8.98845	0.007718
1L by 2Q	5.619112E+07	1	56191118	3.19378	0.090770
1Q by 2L	9.028154E+07	1	90281536	5.13141	0.036071
1Q by 2Q	5.130484E+07	1	51304845	2.91606	0.104891
Error	3.166902E+08	18	17593900		
Total SS	1.773038E+09	26			

Teflubenzuron	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	1326555	1	1326555	1.135363	0.300719
TCA (Q)	6455368	1	6455368	5.524979	0.030348
(2)EDTA (L)	4663500	1	4663500	3.991366	0.061074
EDTA (Q)	3194637	1	3194637	2.734206	0.115554
1L by 2L	159563	1	159563	0.136566	0.716031
1L by 2Q	4154513	1	4154513	3.555738	0.075585
1Q by 2L	73231	1	73231	0.062676	0.805150
1Q by 2Q	2720069	1	2720069	2.328036	0.144441
Error	21031142	18	1168397		
Total SS	43105431	26			

Sarafloxacin	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	5850293	1	5850293	17.75397	0.000522
TCA (Q)	2685454	1	2685454	8.14959	0.010524
(2)EDTA (L)	1254923	1	1254923	3.80833	0.066737
EDTA (Q)	290018	1	290018	0.88012	0.360587
1L by 2L	1680400	1	1680400	5.09954	0.036586
1L by 2Q	654	1	654	0.00198	0.964962
1Q by 2L	1100712	1	1100712	3.34035	0.084226
1Q by 2Q	904559	1	904559	2.74508	0.114881
Error	5931365	18	329520		
Total SS	19864419	26			

Difloxacin	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	10746067	1	10746067	22.80273	0.000151
TCA (Q)	5959622	1	5959622	12.64609	0.002257
(2)EDTA (L)	4779631	1	4779631	10.14219	0.005132
EDTA (Q)	3677	1	3677	0.00780	0.930588
1L by 2L	4438943	1	4438943	9.41926	0.006611
1L by 2Q	527000	1	527000	1.11827	0.304277
1Q by 2L	3424075	1	3424075	7.26575	0.014792
1Q by 2Q	145812	1	145812	0.30941	0.584893
Error	8482720	18	471262		
Total SS	38821279	26			

Tetraciclina	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	13565924	1	13565924	1.806494	0.195626
TCA (Q)	17219273	1	17219273	2.292989	0.147322
(2)EDTA (L)	91621	1	91621	0.012201	0.913269
EDTA (Q)	20774119	1	20774119	2.766367	0.113578
1L by 2L	21447	1	21447	0.002856	0.957969
1L by 2Q	26774492	1	26774492	3.565401	0.075222
1Q by 2L	4592754	1	4592754	0.611590	0.444356
1Q by 2Q	26365385	1	26365385	3.510923	0.077294
Error	135171570	18	7509532		
Total SS	244189524	26			

Oxitetraciclina	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	6470169	1	6470169	2.152641	0.159580
TCA (Q)	5896196	1	5896196	1.961679	0.178337
(2)EDTA (L)	2522681	1	2522681	0.839302	0.371708
EDTA (Q)	2697297	1	2697297	0.897398	0.356026
1L by 2L	233937	1	233937	0.077831	0.783438
1L by 2Q	2183764	1	2183764	0.726544	0.405205
1Q by 2L	1545911	1	1545911	0.514328	0.482475
1Q by 2Q	10541860	1	10541860	3.507303	0.077434
Error	54102389	18	3005688		
Total SS	85367787	26			

Cloretetraciclina	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	34648019	1	34648019	9.935586	0.005513
TCA (Q)	22299442	1	22299442	6.394537	0.021012
(2)EDTA (L)	144828	1	144828	0.041531	0.840803
EDTA (Q)	3500996	1	3500996	1.003938	0.329640

1L by 2L	426539	1	426539	0.122313	0.730598
1L by 2Q	4876050	1	4876050	1.398245	0.252403
1Q by 2L	314977	1	314977	0.090322	0.767212
1Q by 2Q	6031983	1	6031983	1.729718	0.204956
Error	62770763	18	3487265		
Total SS	138243784	26			

Deltametrina	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	2789220	1	2789220	13.67990	0.001644
TCA (Q)	863446	1	863446	4.23482	0.054383
(2)EDTA (L)	159207	1	159207	0.78084	0.388535
EDTA (Q)	186628	1	186628	0.91533	0.351379
1L by 2L	438622	1	438622	2.15125	0.159708
1L by 2Q	180706	1	180706	0.88628	0.358951
1Q by 2L	457470	1	457470	2.24369	0.151492
1Q by 2Q	19829	1	19829	0.09725	0.758735
Error	3670052	18	203892		
Total SS	8693371	26			

Eritromicina	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	58280580	1	58280580	60.27092	0.000000
TCA (Q)	23912472	1	23912472	24.72911	0.000098
(2)EDTA (L)	15572992	1	15572992	16.10482	0.000816
EDTA (Q)	612850	1	612850	0.63378	0.436347
1L by 2L	26180909	1	26180909	27.07501	0.000060
1L by 2Q	1041198	1	1041198	1.07676	0.313164
1Q by 2L	10751292	1	10751292	11.11846	0.003690
1Q by 2Q	418892	1	418892	0.43320	0.518754
Error	17405583	18	966977		
Total SS	########	26			

Tilosina	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	21554500	1	21554500	96.65654	0.000000
TCA (Q)	8861991	1	8861991	39.73970	0.000006
(2)EDTA (L)	654656	1	654656	2.93567	0.103813
EDTA (Q)	595003	1	595003	2.66816	0.119743
1L by 2L	1093853	1	1093853	4.90515	0.039916
1L by 2Q	1024028	1	1024028	4.59203	0.046038
1Q by 2L	456728	1	456728	2.04810	0.169530
1Q by 2Q	414763	1	414763	1.85992	0.189448

Error	4014017	18	223001
Total SS	37951293	26	

Cloranfenicol	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	13452323	1	13452323	10.33655	0.004801
TCA (Q)	11816371	1	11816371	9.07951	0.007467
(2)EDTA (L)	6244154	1	6244154	4.79791	0.041901
EDTA (Q)	308562	1	308562	0.23709	0.632189
1L by 2L	8506054	1	8506054	6.53592	0.019827
1L by 2Q	12090529	1	12090529	9.29017	0.006923
1Q by 2L	4505781	1	4505781	3.46217	0.079205
1Q by 2Q	5726862	1	5726862	4.40043	0.050315
Error	23425787	18	1301433		
Total SS	87563018	26			

Tianfenicol	SS	df	MS	F	p
(1)TCA (L)	1213397	1	1213397	5.66701	0.028543
TCA (Q)	3174016	1	3174016	14.82382	0.001173
(2)EDTA (L)	412982	1	412982	1.92878	0.181838
EDTA (Q)	295	1	295	0.00138	0.970779
1L by 2L	264189	1	264189	1.23386	0.281276
1L by 2Q	751330	1	751330	3.50899	0.077369
1Q by 2L	374306	1	374306	1.74815	0.202666
1Q by 2Q	709183	1	709183	3.31215	0.085441
Error	3854086	#	214116		
Total SS	10704920	#			