



Método Multirresíduo para Determinação de Medicamentos Veterinários em Músculo de Tilápia



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio Ambiente
Ministério da Agricultura e Pecuária**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
95**

**Método Multirresíduo para Determinação de
Medicamentos Veterinários em Músculo de Tilápia**

*Marcia Regina Assalin
Maria Aparecida Rosa
Maria Clara Huttenbergue
Vera Lucia Ferracini
Claudio Martín Jonsson*

**Embrapa Meio Ambiente
Jagariúna, SP
2023**

Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP-340, Km 127,5, Tanquinho Velho
Caixa Postal 69, CEP: 13918-110, Jaguariúna, SP
Fone: +55 (19) 3311-2610
Fax: +55 (19) 3311-2640
www.embrapa.br/meio-ambiente/
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Meio Ambiente

Presidente
Janaina Paula Marques Tanure

Secretária-Executiva
Anderson Soares Pereira

Membros
Janaina Paula Marques Tanure, Cristiano Menezes, Aline Telles Biasoto Marques, Alfredo José Barreto Luiz, Marcos Eliseu Losekann, Maria Cristina Tordin, Maria de Cléofas Faggion Alencar, Nilce Chaves Gattaz, Priscila de Oliveira, Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz e Victor Paulo Marques Simão

Revisão de texto
Eliana de Souza Lima

Normalização bibliográfica
Maria de Cléofas Faggion Alencar, CRB-8/1658

Projeto gráfico
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Silvana Cristina Teixeira

Foto da capa
Vera Lucia Ferracini

1ª edição eletrônica
2023

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Meio Ambiente

Método multirresíduo para determinação de medicamentos veterinários em músculo de tilápia / Márcia Regina Assalin ... [et al.]. – Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2023.

PDF (18 p.) : il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Meio Ambiente, e-ISSN 2965-7326; 95).

1. Medicamentos veterinários. 2. QuEChERS. 3. Validação. 4. LC MS/MS. 5. Músculo de tilápia. I. Assalin, Márcia Regina. II. Rosa, Maria Aparecida. III. Huttenbergue, Maria Clara. IV. Ferracini, Vera. V. Jonsson, Cláudio Martín. VI. Série.

CDD (21. Ed.) 636.089

Maria de Cléofas Faggion Alencar, CRB-8/1658

© Embrapa, 2023

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Materiais e Métodos	8
Resultados e Discussão	11
Análise de Amostras.....	16
Conclusão.....	16
Agradecimentos.....	17
Referências	17

Método Multirresíduo para Determinação de Medicamentos Veterinários em Músculo de Tilápia

Marcia Regina Assalin¹

Maria Aparecida Rosa²

Maria Clara Huttenbergue³

Vera Lucia Ferracini⁴

Claudio Martín Jonsson⁵

Resumo – A piscicultura tem ganhado destaque na cadeia de produção de alimentos no Brasil. O uso de medicamentos veterinários é necessário na criação de peixes em cativeiro, porém, o uso incorreto pode resultar na presença de resíduos no peixe tornando-o inapropriado para o consumo. O objetivo deste trabalho foi validar um método para determinação de sulfatiazol, sulfametazina, sulfametizol, sulfadimetoxina, florfenicol, florfenicol amina, verde de malaquita, leuco verde malaquita e triclorfon em músculo de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Analitos foram extraídos de acordo com o método QuEChERS e analisados por espectrometria de massas (LC-MS/MS). O método demonstrou seletividade e linearidade ($R^2 \geq 0,99$) na faixa de trabalho 0,005 e 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O limite de quantificação para os analitos foi de 20 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Resultados de recuperação e precisão para florfenicol, sulfametazina, sulfadimetoxina e triclorfon foram considerados aceitáveis na faixa de 70% a 120% e coeficiente de variação (CV) $\leq 20\%$. Florfenicol amina, sulfatiazol e sulfametizol apresentaram CV $\leq 20\%$, com valores de recuperação entre 40,4 e 52,3%, inferiores aos considerados aceitáveis. O método analítico proposto não foi adequado para a determinação de verde malaquita, verde leuco malaquita e diclorvós por não atenderem aos parâmetros de validação.

Palavras-chave: medicamentos veterinários, QuEChERS, validação, LC MS/MS, músculo de tilápia

¹ Química, doutora em Ciências, analista da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

² Química, doutora em Ciências, analista da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

³ Bolsista CNPq, graduada em Ciências Biológicas, Pedreira, SP.

⁴ Química, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

⁵ Farmacêutico, doutor em Biologia Funcional e Molecular, pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

Multiresidue Method for Determination of Veterinary Drugs in Tilapia Muscle

Abstract – Pisciculture has gained prominence in the food production chain in Brazil. The use of veterinary drugs is necessary in rearing of captive fish however, incorrect usage can result in the presence of residues in the fish, making it unsuitable for consumption. The objective of this work was to validate an analytical method to determine the concentrations of sulfathiazole, sulfamethazine, sulfamethizole, sulfadimethoxine, florfenicol, florfenicol amine, malachite green, malachite green leuco and trichlorfon in tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle. The analytes were extracted according to QuEChERS method and analyzed by mass spectrometry (LC-MS/MS). The method demonstrated selectivity and linearity ($R^2 \geq 0.99$) in the range 0.005 and 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The quantification limit obtained for all analytes was 20 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Recovery and precision results for florfenicol, sulfamethazine, sulfadimethoxine, and trichlorfon were considered acceptable, in the range of 70% to 120% and coefficient of variation (CV) $\leq 20\%$. Florfenicol amine, sulfathiazole, and sulfamethizole showed CV $\leq 20\%$, with recovery values in the range off 40.4% to 52.3%, which were lower than the acceptable range. The proposed analytical method was not suitable for the determination of malachite green and the metabolites leuco malachite green and dichlorvos, as they did not have the validation parameters.

Key-words: Veterinary drugs, QuEChERS, validation, LCMS/MS, tilapia muscle.

Introdução

A piscicultura é um ramo da aquicultura que tem ganhado destaque na cadeia de produção de alimentos saudáveis. O Brasil é hoje o quarto maior produtor mundial de tilápia, peixe de cultivo que representa a maior parte da produção nacional (Associação Brasileira de Piscicultura, 2023). Sistemas de produção intensivo têm sido adotados para atender a necessidade dos consumidores. A elevada densidade de estocagem de peixes pode levar à ocorrência de infecções devido a fatores relacionados com a qualidade da água e a nutrição insuficiente dos peixes (Shiroma et al., 2020). O uso de medicamentos veterinários na criação de peixes em cativeiro se faz necessário para o controle de diferentes patologias e parasitas, e dessa forma evitar perdas de produtividade (Shiroma et al., 2020). No entanto, a utilização incorreta destes medicamentos pode levar a prejuízos financeiros (produto impróprio para consumo) e ambientais (contaminação do solo e da água) devido à presença de resíduos de medicamentos.

Limite máximo de resíduos (LMR) é a concentração máxima de resíduo de um medicamento veterinário que pode estar presente no alimento, que não resulte em efeitos adversos à saúde humana mesmo se ingerido diariamente ao longo da vida (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2022a). A Instrução Normativa Anvisa nº 162, de 2022, estabelece, entre outros, os valores dos limites máximos de resíduos (LMR) para os insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal.

Dentre os analitos estudados neste trabalho, apenas o florfenicol e seu metabolito florfenicol amina possuem LMR estabelecido em músculo de peixe, cuja concentração máxima legalmente permitida é $1000 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2022a). Em contrapartida, o verde malaquita apresenta LMR não recomendado. A detecção de resíduo de IFA ou seus metabólitos acima do limite previsto, ou que não constem na Instrução Normativa, ou ainda que possuam LMR não recomendado, constitui em infração sanitária (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2022b).

A determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal deve ser realizada por meio de métodos analíticos validados. A validação assegura que os resultados gerados pelo método analítico sejam confiáveis, tanto para identificação quanto para a quantificação dos

compostos desejados na matriz avaliada (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2022b).

O preparo de amostras de matrizes complexas deve ser eficiente de forma a reduzir a presença de interferentes, minimizando assim problemas como efeito matriz, que podem afetar a exatidão do método (Lopes et al., 2012). O método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) tem sido cada vez mais utilizado para a determinação de medicamentos veterinários em matrizes de origem animal, resultando em altos valores de recuperação (Anastassiades et al., 2003; Barbieri et al., 2019; Dinh et al., 2020; Kalogeropoulou, et al., 2021; Kaufmann et al., 2023).

Algumas vantagens deste método são rapidez, eficiência, baixa geração de resíduos, além de pequena quantidade de amostra requerida, o que muitas vezes é um fator limitante para matrizes de origem animal (Baptista et al., 2017; Kim et al., 2023).

Com intuito de contribuir com ações que visam garantir a segurança do alimento, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico para determinação de sulfatiazol, sulfametazina, sulfametizol, sulfadimetoxina, florfenicol (e metabólito florfenicol amina), verde de malaquita (e metabólito leuco verde malaquita) e triclorfon (metabólito diclorvós) em músculo de tilápia (*Oreochromis niloticus*), baseado na extração QuEChERS e análise por espectrometria de massas sequencial (LC MS/MS).

Materiais e Métodos

Reagentes e soluções

Acetonitrila (LiChrosolv®, pureza $\geq 99,9$ %) e Metanol (LiChrosolv®, pureza $\geq 99,8$ %) foram adquiridos da Supelco (Massachusetts, USA). Acetato de sódio anidro (CH_3COONa), sulfato de magnésio anidro (MgSO_4), ácido acético glacial (pureza ≥ 99 %) e ácido fórmico (pureza ≥ 96 %) foram adquiridos da Sigma-Aldrich ((Missouri, USA). Amina primária secundária (PSA) foi fornecida pela Agilent Technologies (Wilmington, USA). Padrões analíticos foram adquiridos da Sigma Aldrich e Dr. Ehrenstorfer, todos com pureza superior a 98 % (Tabela 1).

Tabela 1. Padrões analíticos utilizados na quantificação dos medicamentos veterinários e produtos de degradação em músculo de tilápia

Composto	Fórmula molecular	Massa molar (mol g ⁻¹)	Pureza (%)
Diclorvós	C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P	220,9763	99,8
Florfenicol	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ FNO ₄ S	358,2173	99,9
Florfenicol Amina	C ₁₀ H ₁₄ FNO ₃ S	247,2905	99,8
Verde Leuco / Malaquita	C ₂₃ H ₂₆ N ₂	330,4729	99,6
Sulfatiazol	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	255,3215	100,0
Sulfametizol	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂	270,3362	99,5
Sulfametazina	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	278,3349	99,6
Sulfadimetoxina	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310,3337	99,0
Triclorfon	C ₄ H ₈ Cl ₃ O ₄ P	257,4370	98,4
Verde Malaquita	C ₂₃ H ₂₅ N ₂	329,4650	98,0

Soluções-Padrão

Foram preparadas soluções estoque de cada um dos compostos a serem analisados na concentração de 1000 µg mL⁻¹. A solução de trabalho foi preparada por meio de diluições apropriadas da solução estoque de cada analito em acetonitrila, resultando em uma única solução de trabalho, na concentração de 10 µg mL⁻¹. Todas as soluções foram armazenadas a - 20 °C.

Amostras

Para o desenvolvimento e validação do método analítico, amostras de músculo de peixe foram obtidas de peixes mantidos em tanques experimentais da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP) que não foram expostos a nenhum medicamento veterinário (amostras branco). As amostras de músculo de tilápia foram homogeneizadas utilizando-se um Robot Coupe Blixer 3 (Bourgogne, France) e armazenadas a - 20 °C até o momento do uso.

Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente.

Para as análises de monitoramento foram utilizadas 10 amostras de filé de tilápia congelado, comercializadas no mercado varejista local (Campinas, SP).

Preparo das Amostras

O método de extração dos analitos foi baseado no método QuEChERS acetato (*Association of Official Chemists* (AOAC), com pequenas modificações (AOAC International, 2007). Foram pesados 10 g de amostra em tubos de polipropileno (50 mL), seguido pela adição de 10 mL de acetonitrila (1 % de ácido acético) e submetidas a cinco (5) minutos de agitação (Multi Reax Heidolph Apparatus). A etapa de *salting-out* foi realizada pela adição de 4 g de sulfato de magnésio anidro e 1 g de acetato de sódio anidro e agitação por mais cinco (5) minutos. A separação das fases foi obtida por meio de centrifugação a 10.000 rpm, 10°C durante cinco (5) minutos (Multifuge 3L-RHeraeus). A limpeza do extrato (*clean-up*) foi realizada por meio de precipitação a baixa temperatura seguida por extração em fase sólida dispersiva (*d-SPE*). Para isso, uma alíquota de 5 mL do sobrenadante foi transferida para outro frasco de polipropileno e mantida a -18 °C durante 90 minutos. Em seguida, uma alíquota de 4 mL foi retirada e submetida à *d-SPE* por meio da adição de 500 mg de sulfato de magnésio e 150 mg de PSA, agitação (2 minutos) e centrifugação (10.000 rpm, 10°C, 5 minutos). Então, 2 mL do sobrenadante foram evaporados sob fluxo de N₂ até a secura e reconstituídos em 1 mL de fase móvel (metanol: ácido fórmico 0,1 %, 30:70, V/V), filtrado (filtro de seringa, PVDF, 0,22 µm) e submetido à análise por LC MS/MS.

Instrumentação e condições analíticas de análise

Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas, com analisador de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS, QqQ), com fonte de ionização *electrospray* (ESI), ambos da Waters® (modelo Quattro Premier XE). O sistema foi operado em modo positivo e negativo de ionização. As condições de aquisição foram: capilar de 3 kV, extrator de 3 V, temperatura da fonte de 110 °C, temperatura e fluxo do gás de dessolvatação (N₂) iguais a 350 °C e 450 L h⁻¹, respectivamente. O sistema

operou em modo gradiente de eluição, sendo (A) solução aquosa de ácido fórmico 0,1% e (B) metanol. O gradiente iniciou-se em 30% de (B), alterando-se linearmente para 40 % (B) durante três (3) minutos. Em 3,1 minutos alterou-se para 80 % de (B) e manteve-se nesta condição até cinco (5) minutos. Finalmente, incrementou-se para 100 % de (B) durante 0,3 minutos, sendo o equilíbrio inicial reestabelecido, totalizando oito (8) minutos de corrida.

A coluna utilizada foi a BEH C1,7 μm x 2,1 x 100 mm (Waters®), mantida à temperatura constante de 35 °C, vazão de 0,225 mL min⁻¹ e volume de injeção igual a 20 μL . Foram monitoradas duas transições para cada analito (quantificação e confirmação), sendo a mais intensa utilizada para quantificação (European Union Reference Laboratories, 2020). As transições selecionadas em modo MRM (*multiple reaction monitoring*) estão apresentadas na Tabela 2.

Validação do método analítico

Os parâmetros de desempenho avaliados foram selecionados de acordo com o guia INMETRO/DOQ-CGCRE-008 e, SANTE/12682/2019, sendo eles seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão e efeito matriz (Instituto Nacional de Metrologia, 2020, European Union Reference Laboratories, 2020).

Resultados e Discussão

As principais modificações introduzidas neste estudo em relação ao método original QuEChERS-acetato (AOAC International, 2007) são referentes à etapa de *clean-up*. A presença de lipídeos pode resultar numa pobre separação cromatográfica, além de interferir nos limites de detecção e quantificação dos compostos analisados. Assim, o *clean-up* foi realizado em duas etapas, a primeira visando à precipitação de lipídeos em baixas temperaturas (-18 °C), seguida pela extração em fase sólida dispersiva (*d - SPE*) para a remoção de ácidos orgânicos, excesso de água e outros componentes da matriz, utilizando-se MgSO_4 e PSA (Baptista et al., 2017). MgSO_4 é usado para remoção de água da fase orgânica, enquanto PSA é necessário para a remoção de ácidos graxos, pigmentos e outros compostos

polares provenientes da matriz (Kosma et al., 2021). A Tabela 2 mostra o modo de ionização, tempo de retenção e as transições monitoradas para cada analito.

Tabela 2. Parâmetros de aquisição do espectrômetro de massas para os compostos analisados

Composto	Modo de ionização	Tempo de retenção (min)	Ion precursor (m/z)	Transições
Diclorvós	ESI+	4,57	221,0	221>79 221>109
Florfenicol	ESI-	2,29	356,0	356>185 356>336
Florfenicol Amina	ESI+	1,10	248,0	248>130 248>230
Verde Leuco Malaquita	ESI+	5,23	331,2	331,2>239 331,2>315
Sulfatiazol	ESI+	1,44	256,0	256>92 256>156
Sulfametizol	ESI+	1,90	271,0	271>108 271>156
Sulfametazina	ESI+	1,94	279,0	279>92 279>186
Sulfadimetoxina	ESI+	3,88	311,0	311>92 311>156
Triclorfon	ESI+	2,76	259,0	259>79 259>109
Verde Malaquita	ESI+	4,63	329,2	329,2>165 329,2>313

A seletividade do método foi avaliada através da comparação dos cromatogramas de amostras branco da matriz com cromatogramas de amostras fortificadas na menor concentração de interesse. Nenhum pico (sinal analítico, íon traço) interferente foi observado no mesmo tempo de retenção para a mesma m/z, demonstrando a seletividade do método (Figura 1).

O efeito matriz foi avaliado de acordo com a Equação 1 (European Union Reference Laboratories, 2020). Para tanto, foram preparadas soluções-padrão dos analitos no extrato da matriz e na fase móvel na concentração de $0,050 \mu\text{g mL}^{-1}$

$$\% EM = \left(\frac{AEM}{AFM} - 1 \right) \times 100$$

Onde: % EM - % de efeito matriz

AEM - área do pico cromatográfico no extrato da matriz

AFM - área do pico cromatográfico na fase móvel

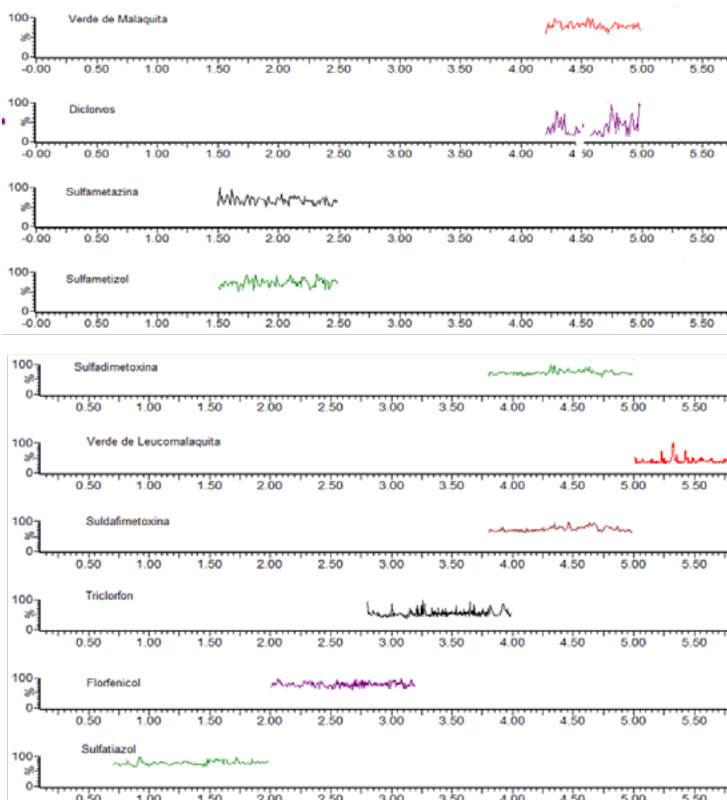


Figura 1. Cromatograma de ions totais para a amostra branco da matriz.

É considerado efeito matriz o aumento ou supressão do sinal analítico em relação ao sinal obtido na mesma concentração do analito preparado na fase móvel. Supressão do sinal analítico foi observado para os compostos verde leuco malaquita (24 %), florfenicol amina (66 %) e verde malaquita (85 %). Apenas a sulfametazina apresentou aumento do sinal analítico (30 %). Neste tipo de matriz é comum a presença de proteínas e lipídios que dificultam a eficiência de evaporação do analito, reduzindo a quantidade de íons para geração da resposta analítica (Kim et al., 2023).

Devido à verificação da interferência da matriz na resposta analítica, adotou-se a construção da curva analítica na matriz. A linearidade foi avaliada por meio de curvas analíticas construídas no extrato da matriz, com sete níveis de concentração compreendidos entre 0,005 e 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados obtidos foram analisados pelo método de regressão dos mínimos quadrados e expressos como coeficiente de determinação (r^2). Todas as curvas analíticas apresentaram valores de coeficientes de determinação superiores a 0,99 sendo, portanto, lineares (Kim et al., 2023).

O limite de detecção (LD) foi determinado considerando-se a menor concentração do analito, que resultou num coeficiente de variação inferior a 20 % das áreas obtidas após a injeção de seis replicatas ($n=6$). O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido como a menor concentração validada com exatidão e precisão aceitáveis, para cada pesticida. A exatidão (recuperação) foi avaliada em dois níveis de fortificação, 20 e 50 mg Kg^{-1} , em dois dias diferentes, totalizando 10 repetições ($n=10$), sendo considerados aceitáveis valores de recuperação compreendidos entre 70 e 120%. Já a precisão intradia foi avaliada em cinco (05) replicatas ($n=5$), analisadas no mesmo dia, nos dois níveis de fortificação mencionados. Já a precisão interdias foi avaliada num total de 10 repetições ($n = 10$) em dias diferentes, nos mesmos níveis de fortificação. Foram considerados aceitáveis valores de $\text{CV} \leq 20\%$ para a precisão. A Tabela 3 apresenta os parâmetros de desempenho obtidos para cada analito no processo de validação do método.

Tabela 3. Parâmetros de desempenho obtidos na validação do método analítico

Composto	LD $\mu\text{g Kg}^{-1}$	LQ $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Exatidão (%) (n=5)	Precisão Intradias (n=5) CV%	Precisão Interdias (n=10) CV %
Diclorvós	5	20	51,1 49,9	37,6 24,9	23,1 40,2
Florfenicol	5	20	100,7 112,9	6,7 4,1	5,4 4,1
Florfenicol Amina	5	20	40,4 44,6	10,2 11,2	10,9 11,6
Verde Leuco Malaquita	5	20	34,6 40,2	46,0 28,9	48,5 35,0
Sulfatiazol	5	20	50,2 52,3	9,5 9,6	10,4 10,3
Sulfametizol	5	20	42,5 47,5	9,1 12,7	9,2 10,7
Sulfametazina	5	20	74,4 76,9	1,3 3,6	3,3 5,6
Sulfadimetoxina	5	20	77,3 78,0	4,0 6,7	3,7 5,4
Triclorfon	5	20	88,9 88,1	3,5 3,2	6,4 3,8
Verde Malaquita	5	20	Não detectado	Não detectado	Não detectado

Resultados de recuperação e precisão para os analitos, florfenicol sulfametazina sulfadimetoxina e triclorfon foram considerados aceitáveis, apresentando valores de recuperação compreendidos entre 70 % e 120 % e $CV \leq 20$ %. Os compostos florfenicol amina, sulfatiazol e sulfametazina, embora tenham apresentado resultados de precisão satisfatórios ($CV \leq 20$ %), os valores de recuperação variaram entre 40,4 e 52,3 %, não atingindo assim os critérios de desempenho considerados (70-120 %) satisfatórios para a quantificação. Dessa forma, foram considerados no método apenas com o objetivo de detecção nas amostras de filé de tilápia.

Diclorvos, verde malaquita e seu produto de degradação, verde leuco malaquita não foram considerados no método analítico devido a parâmetros insatisfatórios tanto de recuperação quanto de precisão.

Análise de amostras

O método validado foi utilizado para análise de 10 amostras reais de filé de tilápia congelado, comercializadas no mercado varejista local (Campinas, SP).

Como controle de qualidade, amostras branco fortificadas (n=2) foram analisadas juntamente com as amostras reais obtendo recuperação de todos os analitos validados na faixa aceitável (70 a 120%). Nas amostras reais não foram quantificados resíduos dos medicamentos veterinários em concentrações iguais ou maiores que o LQ estabelecido (20 µg Kg⁻¹).

Conclusão

O método QuEChERS-acetato com pequenas modificações foi utilizado no preparo de amostras de músculo de tilápia para a determinação de medicamentos veterinários por LC MS/MS. Quatro compostos resultaram em recuperação maior que 70 %. Os compostos florfenicol amina, sulfatiazol e sulfametazina, embora tenham apresentado resultados de precisão satisfatórios (CV ≤ 20 %) os valores de recuperação foram inferiores a 70% sendo considerados no método apenas com o objetivo de detecção. Diclorvos, verde malaquita e seu produto de degradação, verde leuco malaquita não foram considerados no método analítico devido a parâmetros insatisfatórios tanto de recuperação quanto de precisão. Não foram encontrados resíduos dos analitos estudados nas amostras analisadas.

Agradecimentos

Aos patrocinadores do projeto BRS Aqua (Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social - BNDES), Sub-processo número 16.2.0225.1.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Iniciação Tecnológica e Industrial (DTI-C).

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Instrução normativa ANVISA in n. 162, de 1º de julho de 2022. Estabelece a ingestão diária aceitável (IDA), a dose de referência aguda (DRfA) e os limites máximos de resíduos (LMR) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. **Diário Oficial da União**, nº 126, de 6 de julho de 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada -RDC Anvisa n. 730, de 1º de julho de 2022. Dispõe sobre a avaliação do risco à saúde humana de medicamentos veterinários, os limites máximos de resíduos (LMR) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal e os métodos de análise para fins de avaliação da conformidade. **Diário Oficial da União**, nº 126, de 6 de julho de 2022.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. F. 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, p. 412-431, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>. Acesso em: 24 jul. 2023.

AOAC INTERNATIONAL. AOAC official method 2007.01. Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. First action 2007. 9 p. Disponível em: <https://nucleus.iaea.org/sites/fcris/Shared%20Documents/SOP/AOAC_2007_01.pdf>. Acesso em: 24 jul. 2023.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA. **Anuário 2023 peixe BR da piscicultura: a força do peixe brasileiro**. Disponível em <https://www.peixebr.com.br/anuario/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

BAPTISTA, R. C.; FERNANDES, M. A. M.; GILAVETE, S.; QUIEROZ, C. N.; ASSALIN, M. R.; FERRACINI, V. L.; MONTEIRO, A. L. G.; REYES, F. G. R. Determination of moxidectin in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in pharmacokinetic study in lambs. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 28, p.250-256, 2017.

BARBIERI, M. V.; POSTIGO, C.; GUILLEM-ARGILES, N.; MONLLOR-ALCARAZ, L. S.; SIMIONATO, J. I.; STELLA, E.; BARCELO, D.; ALDA, M. L. Analysis of 52 pesticides in fresh fish muscle by QuEChERS extraction followed by LC-MS/MS determination. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 958-967, 2019.

DINH, N.; MUNOZ, G.; DUJ, S. V.; DO, D. T.; BAYEN, S.; SAUVÉ, S. Analysis of sulfonamides, fluoroquinolones, tetracyclines, triphenylmethane dyes and other veterinary drug residues in cultured and wild seafood sold in Montreal, Canada. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.94, 103630, 2020.

EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORIES. **Main changes introduced in document n. SANTE/12682/2019 with respect to the previous:** (Document N° SANTE/11813/2017). 01 Jan. 2020. 49 p. Disponível em: <https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf>. Acesso em 24 jul. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Normalização e qualidade industrial. orientação sobre validação de métodos analíticos documento de caráter orientativo:** DOQ-CGCRE-08. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_08.pdf>. Acesso em: 24 jul. 2023.

KALOGEROPOULOU, A. G.; KOSMA, C. I.; ALBANIS, T. A. Simultaneous determination of pharmaceuticals and metabolites in fish tissue by QuEChERS extraction and UHPLC Q/Orbitrap MS analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.413, p. 129–7140,2021.

KAUFMANN, A.; BUTCHER, P.; MADEN, K.; WALKER, S.; WIDMER, M. Assessment and validation of the p-QuEChERS sample preparation methodology for the analysis of >200 veterinary drugs in various animal-based food matrices. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 40, p.356-372, 2023.

KIM, K.; CHOI, Y.; MOK, S.; MOON, H. B. Optimization of the QuEChERS method for multi-residue analysis of pharmaceuticals and pesticides in aquaculture products. **Food Chemistry**, v. 399 133958, 2023.

KOSMA, C. I.; KOLOKA, O. L.; ALBANIS, T. A.; KONSTANTINOOU, K. Accurate mass screening of pesticide residues in wine by modified QuEChERS and LC-hybrid LTQ/Orbitrap-MS. **Food Chemistry**, v.360, 13000, 2021.

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

SHIROMA, L. S.; QUEIROZ, S. C. N.; JONSSON, C. M.; BOTTOLI, C. B. G. Extraction strategies for simultaneous determination of florfenicol and florfenicol amine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle: quantification by LC-MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 13, p. 291-302, 2020.

Embrapa

Meio Ambiente

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
UNIÃO E RECONSTRUÇÃO