



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

**PEDRO PRATES VALÉRIO**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO  
PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE CLORANFENICOL EM  
PESCADO POR CLAE-ESI/EM/EM**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado**

***DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC-ESI/MS/MS  
ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF  
CHLORAMPHENICOL RESIDUES IN FISH***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À FACULDADE  
DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS**

***MASTER THESIS PRESENTED TO THE FACULTY OF FOOD  
ENGINEERING OF THE UNIVERSITY OF CAMPINAS TO OBTAIN  
THE MASTER GRADE IN FOOD SCIENCE***

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO "DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE CLORANFENICOL EM PESCADO POR CLAE-ESI/EM/EM DEFENDIDA PELO ALUNO PEDRO PRATES VALÉRIO, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCELO ALEXANDRE PRADO

**Assinatura do Orientador**

---

**CAMPINAS, 2012**





**PEDRO PRATES VALÉRIO**

**“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO  
PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE CLORANFENICOL EM  
PESCADO POR CLAE-ESI/EM/EM”**

***“DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC-ESI/MS/MS  
ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF  
CHLORAMPHENICOL RESIDUES IN FISH”***

**CAMPINAS**

**2011**





UNICAMP

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

**PEDRO PRATES VALÉRIO**

**“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A  
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE CLORANFENICOL EM PESCADO  
POR CLAE-ESI/EM/EM”**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado**

***“DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC-ESI/MS/MS ANALYTICAL  
METHOD FOR THE DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL  
RESIDUES IN FISH”***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em  
Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

*Master Thesis presented to the Food Science Postgraduation Programme of  
the School of Food Engineering of the University of Campinas to obtain the Master grade in Food  
Science.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO “DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO  
DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE CLORANFENICOL EM PESCADO POR  
CLAE-ESI/EM/EM DEFENDIDA PELO ALUNO PEDRO PRATES VALÉRIO, E ORIENTADA PELO PROF. DR.  
MARCELO ALEXANDRE PRADO

**Assinatura do Orientador**

---

**CAMPINAS**

**2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

V237d Valério, Pedro Prates  
Desenvolvimento e validação de método analítico para a determinação de resíduos de cloranfenicol em pescado por CLAE-ESI/EM/EM / Pedro Prates Valério. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Marcelo Alexandre Prado.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Cloranfenicol. 2. Antibióticos. 3. Pescado. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Espectrometria de massa. I. Prado, Marcelo Alexandre. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Development and validation of HPLC-ESI/MS/MS analytical method for the determination of chloramphenicol residues in fish

Palavras-chave em inglês:

Chloramphenicol

Antibiotics

Fish

High performance liquid chromatography

Mass spectrometry

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Marcelo Alexandre Prado [Orientador]

Helena Teixeira Godoy

Jesuí Vergílio Visentainer

Data da defesa: 30-06-2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

**MARCELO ALEXANDRE PRADO**

ORIENTADOR

---

**HELENA TEIXEIRA GODOY**

MEMBRO TITULAR

---

**JESUÍ VERGILIO VISENTAINER**

MEMBRO TITULAR

---

**ADRIANA DILLEMBURG MEINHART**

MEMBRO SUPLENTE

---

**RAQUEL GRANDO DE OLIVEIRA**

MEMBRO SUPLENTE



*Dedico este trabalho aos meus pais, Alberto e Maria, e ao meu Tio Henrique*



## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo amor, saúde, clareza e força nesta prazerosa caminhada;

Aos meus maiores exemplos e educadores, Pai, Mãe, Vós Izo e Lauro e Vós Célia e Lúcia;

À minha irmã Gabriela, meu cunhado Thiago e meus sobrinhos Luquinhas e Bernardinho;

Aos meus Tios e Tias, primas e primos que amo incondicionalmente, Tio Henrique e Tia Janete, Tio Dú e Tia Dê, Tio Nando e Tia Janaína, Tio Reinaldo, Tio Pai e Tia Germana, Dinda e Tio Alexandre, Bu, Lu, Lá, Nana, Augusto, Mari, João, Enzo, Yan, Luan, Joshua e David;

Às queridas e amadas Zezé Gentil, Tia Yeda Bernis e à minha madrinha Tia Danuza;

À incrível e especial Turma do Funil;

À galera do Gut's;

À minha amada Teté, pelo carinho, paciência e companhia mais que especial e verdadeira;

Aos queridos amigos, neste momento representados pelo Lucão Martins, Julia Motta, Warley Pinheiro, Larissa Bontempo, Paty Amaral, Paty Barros, Juliana Rigueira, Cecília Muller, Regina Adão, Regina Carvalho, Rummenigge Oliveira, Letícia Gudi, Guilherme Reis, Polly Port's, Natália Zancan e Juliana Hashimoto;

Às professoras Doutoras Helena Teixeira Godoy e Juliana Azevedo Lima Pallone;

Aos Professores do programa de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP;

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, neste momento representados pelos colegas Marcos Sampaio e Cosme Perota;

À professora Doutora Scheylla Vitorino Carvalho de Souza Ferreira;

À amiga e professora Doutora Roseane Batitucci Passos de Oliveira;

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia da UFMG;

Ao Professor Doutor Rodnei Augusti da Faculdade de Química da UFMG;

Aos Pesquisadores e Professores Doutores Edgar de Alencar Teixeira, Eduardo Maldonado Turra, e colegas do Laboratório de Aquacultura (Laqua), da Escola de Veterinária, da UFMG;

Ao amigo Alexandre, da Elétrica da UFMG;

Ao Ícaros e pessoal da Atlas Copco;

Ao Hélio Martins e pessoal da Applied Biosystems;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro  
E pelas oportunidades e demonstração de determinação, um agradecimento especial à  
Professora Dra. Maria Beatriz Abreu Glória, PHD, chefe do LBqA, na Faculdade de  
Farmácia da UFMG.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tilápia da espécie Nilótica ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	6
<b>Figura 2:</b> Evolução da produção aquícola nacional (t) de 1980 a 2010	8
<b>Figura 3.</b> Produções aquícolas continentais (t), por unidades de Federação	9
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do cloranfenicol	21
<b>Figura 5.</b> Tanques do Laqua / UFMG, e tilápias Nilóticas ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).	33
<b>Figura 6.</b> Fluxograma da metodologia de extração	37
<b>Figura 7.</b> Gradiente de eluição cromatográfica do método	38
<b>Figura 8.</b> Esquema do sistema ESI/EM/EM (MARTINS JUNIOR et al., 2006)	39
<b>Figura 9.</b> Cromatograma da amostra padrão nas condições de separação e detecção estabelecidas	45
<b>Figura 10.</b> Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curvas de cloranfenicol analisada em solvente (ei = resíduo da regressão)	46
<b>Figura 11.</b> Curva de calibração de cloranfenicol em solvente (0,15 a 1,65ng/mL), com sua equação da reta e seu coeficiente de determinação	48
<b>Figura 12.</b> Curva de calibração de cloranfenicol na faixa correspondente a 0,03 – 0,33µg/Kg) com sua equação da reta e seu coeficiente de determinação	48
<b>Figura 13:</b> Cromatograma de cloranfenicol em solvente: TIC; XIC e espectro MS <sup>2</sup> (fragmentos: 320.9>152.1; 320.9>152.1; 320.9>256.9 (PI)	49
<b>Figura 14:</b> Cromatograma de cloranfenicol em matriz: TIC; XIC e espectro MS <sup>2</sup> (fragmentos: 320.9>152.1; 320.9>152.1; 320.9>256.9 (PI) – 0,15ng/mL	49
<b>Figura 15.</b> Curva de calibração de cloranfenicol na matriz tilápia (0,15 a 1,65ng/mL), com sua equação da reta e seu coeficiente de determinação	50
<b>Figura 16.</b> Sobreposição das curvas de calibração de cloranfenicol, em solvente e em matriz (0,15 a 1,65ng/mL) - diferença significativa entre inclinações ( $\alpha$ 0,05)	51
<b>Figura 17.</b> A = Cromatograma típico (“Extracted Ion Chromatogram” – XIC) de amostra de tilápia isenta de analito cloranfenicol e B = Cromatograma (“Extracted Ion Chromatogram” – XIC) da amostra de padrão correspondent a 0,03µg/Kg	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Produção total, continental e marinha, da aquicultura no Brasil	9
<b>Tabela 2:</b> Produção aquícola continental, por espécie (2008 a 2010)	10
<b>Tabela 3:</b> Principais destinos do pescado brasileiros	11
<b>Tabela 4</b> Relação de antibióticos para uso veterinário	15
<b>Tabela 5:</b> Relação de antibióticos usados na aquicultura de certos países	15
<b>Tabela 6:</b> Parâmetros: potencial de orifício (DP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da cela de colisão (CXP) utilizados no método, para transições em modo MRM	39
<b>Tabela 7.</b> Critérios de aceitabilidade do desvio padrão relativo (DPR) para cada nível de concentração	43
<b>Tabela 8.</b> Avaliação das premissas do modelo e da linearidade para a curva de cloranfenicol, em solvente	47
<b>Tabela 9.</b> Avaliação das premissas do modelo e da linearidade para a curva de cloranfenicol, em matriz tilápia	50
<b>Tabela 10.</b> Comparação entre as interseções e inclinações das curvas de calibração na matriz tilápia, e em solvente, para cloranfenicol (2,0 - 10,0mg/L)	51
<b>Tabela 11.</b> Médias de recuperação aparente e desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de tilápia adicionadas de cloranfenicol em níveis determinados de concentração	52
<b>Tabela 12.</b> Limites de detecção e de quantificação para cloranfenicol, na matriz tilápia	53
<b>Tabela 13.</b> Resultados das amostras aleatórias analisadas	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

API	- Atmospheric Pressure Ionization
BSTFA	- <i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
CAD	- Collisionally Activated Dissociation
CAP	- Cloranfenicol / Chloramphenicol
CE	- Colision Energy (energia de colisão)
CI	- Ionização química
CID	- Dissociação induzida por colisão
CL	- Cromatografia Líquida
CL-EM	- Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas
CL-EM/EM	- Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas em <i>tandem</i>
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG	- Cromatografia Gasosa
CUR	- Curtain Gas
CXP	- Cell Exit Potential (potencial de saída da cela de colisão)
D5-CAP	- Cloranfenicol Deuterado
DP	- Declustering Potential (potencial de orifício)
EC	- European Commission
ECD	- Detector de captura de elétrons
EI	- Electron Impact
ELISA	- Enzimaimunoensaio
EM	- Espectrometria de Massas
EP	- Entrance Potential (potencial de entrada)
ESI	- Ionização “electrospray”
FAO	- Food and Drug Administration
GS1	- Nebulizer Gas (gás nebulizante)
GS2	- Heater Gas (gás secante aquecido)
HMDS	- Hexametildisilazano
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDA	- Ingestão Diária Aceitável
IE	- Impacto de Elétrons

IPA	- Ionização à Pressão Atmosférica
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
JECFA	- Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives
LD	- Limite de Detecção
LMDR	- Limite Máximo de Desempenho Requerido
LMR	- Limite Máximo de Resíduos
LQ	- Limite de Quantificação
MRM	- Multiple Reaction Monitoring
MS	- Mass Epectrometry
MSTFA	- <i>N</i> -metil- <i>N</i> (trimetilsilil)-trifluoroacetamida
NCI	- Negative Chemical Ionization
IQN	- Ionização Química Negativa
LC	- Liquid Chromatography
LC-MS	- Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
LC-MS/MS	- Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry
OIE	- Word Organization for Animal Health
PCRPP	- Programa de Controle de Resíduos em Pescado
PNCRC	- Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PNCRBC	- Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Carne
SEAP	- Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca
SIF	- Serviço de Inspeção Federal
RPM	- Rotações por minuto
t	- Toneladas (Sistema Internacional de Unidades – SI)
TAP	- Tianfenicol
TMCS	- Trimetilclorossilano
WHO	- World Health Organization

## RESUMO

O crescimento do setor aquícola no Brasil se encontra em evidência. Em 2010 o volume produtivo foi maior que 479.390 toneladas, apresentando incrementos de 15,3%, em relação à produção de 2009, e 31,2%, em relação ao triênio 2008-2010. Neste mesmo ano de 2010, a aquicultura continental brasileira registrou volumes produtivos na ordem de 394.340 toneladas, das quais 63,4% foram representadas pela soma de tilápia e carpa. Na piscicultura nacional e mundial, principalmente em regiões tropicais, a tilápia representa uma das espécies mais indicadas para o cultivo intensivo. Dados da Balança Comercial de Pescados apontam que em 2005 o volume de exportação de tilápia brasileira já se aproximava de 314,8 toneladas. Em 2010 o montante de pescado brasileiro exportado se aproximou de US\$ 263 milhões. Neste período os principais países importadores foram EUA, Europa e Ásia. A Comunidade Européia estabelece barreiras à exportação do pescado brasileiro, na busca pelo atendimento a exigências quanto à comprovação de teores de contaminantes, tais quais antibióticos, em produtos importados. Quanto ao cloranfenicol, a preocupação se relaciona à proibição de seu uso em animais destinados ao consumo humano, baseada em evidências toxicológicas como a ocorrência de anemia aplástica. Outro fator que contribui para a imposição de barreiras à exportação nacional é a falta de dados analíticos relacionados a pescados brasileiros. Para determinação analítica de Cloranfenicol, o método de cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (CL-EM) é exigido em função de sua sensibilidade e seletividade. Métodos rápidos e eficientes se fazem necessários. Perante tais necessidades, este trabalho desenvolveu e validou uma metodologia analítica para determinação quantitativa de resíduos de cloranfenicol em pescado. O procedimento de extração apresentou inúmeras vantagens: é rápido, direto, apresenta baixo custo, e exclui etapas adicionais de limpeza (como extração em fase sólida). Ainda, utiliza pequenas quantidades de amostra e de solvente. Na etapa de separação e detecção foi empregada a técnica cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massas em “*tandem*” com ionização por “*electrospray*” (CLAE-ESI/EM/EM). O método se adéqua à Comissão de Decisão 2002/657/EC quanto ao número de pontos de identificação requeridos pela para substâncias com tolerância zero. O tempo de corrida cromatográfica foi igual a 9 minutos. O método é linear na faixa entre 0,03µg/kg e 0,33µg/kg, além de preciso, e exato. Recuperações variaram entre 91,33 e 108,00%. A transição de quantificação 321.9>152.1 apresentou LQ igual a 0,03µg/kg, sendo o LMDR requerido pela *Commission Decision* 2003/181/EC  $\leq$  0,30µg/kg.

**PALAVRAS-CHAVE:** cloranfenicol; antibiótico; pescado; cromatografia líquida de alta eficiência; espectrometria de massas

## ABSTRACT

The growth of the aquaculture industry in Brazil is in evidence. In 2010, domestic production was greater than 479,390 tons, showing an increase of 15.3% compared to 2009 production, and of 31.2% compared to the period 2008-2010. In the same year, the Brazilian continental aquaculture recorded production volumes of around 394,340 tonnes, of which 63.4% were represented by the sum of tilapia and carp. Tilapia is one of the most suitable species for intensive fish farming. In 2005 the export volume of Brazilian Tilapia had already approached 314.8 tons. . In 2010 Brazil exported U.S. \$ 263 million in fish. The main importers were U.S.A., Europe and Asia. The European Community establishes barriers to Brazilian exports of fish. There is a need of meeting requirements of laboratory tests in order to show levels of antibiotics in certain products. The concern in relation to chloramphenicol relates to the prohibition of its use in animals intended for human consumption, due to toxicological factors such aplastic anemia. Another factor that contributes to the imposition of trade barriers is the lack of available data concerning its presence in Brazilian fishes. For the determination of chloramphenicol in fishes, the method LC-MS (liquid chromatography with detection by mass spectrometry) is required due to its sensitivity and selectivity. Methods for the analysis of chloramphenicol should be related to speed and efficiency. Given these needs, this study developed and validated an analytical method for quantitative determination of chloramphenicol residues in fish. The extraction procedure has shown several advantages: is fast, direct, is inexpensive and eliminate additional cleanup steps (i.e. solid phase extraction). What is more, requires low amounts of sample and of solvents. For the separation and detection steps, HPLC-ESI/MS/MS has been employed. The method is adequate for the number of identification points required by the Commission Decision 2002/657/EC for substances with zero tolerance,. In chromatography, the run time was equal to 9 minutes. The method is linear in the range between 0.03µg/kg and 0.33µg/kg. It is also precise, and accurate. Recoveries ranged between 91.33 and 108.00%. The quantification transition 321.9>152.1 showed a LOD and LOQ of 0.03µg/kg. The MLPR required by Commission Decision 2003/181/EC is of 0.30mg / kg.

**KEYWORDS:** chloramphenicol; antibiotic; fish; high performance liquid chromatography; mass spectrometry.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	4
2.1 PEIXES	4
2.1.1 Tilápia	6
2.2 PESCA EXTRATIVA, AQUICULTURA E PSICULTURA	8
2.2.1 Piscicultura e meio ambiente	12
2.3 EMPREGO DE ANTIBIÓTICOS NA PRODUÇÃO ANIMAL	13
2.3.1 Consequências do uso antibióticos para a saúde pública	16
2.4 RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM ALIMENTOS	17
2.5 CONTROLE DE RESÍDUOS NO BRASIL	19
2.6 CARACTERIZAÇÃO DO CLORANFENICOL	21
2.7 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE CLORANFENICOL EM PESCADO	22
2.7.1 Detecção e quantificação de resíduos de cloranfenicol	22
2.7.2 Etapa de extração de CAP	24
2.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	25
2.8.1 Seletividade	27
2.8.2 Efeito Matriz	28
2.8.3 Linearidade	28
2.8.4 Faixa de aplicação	29
2.8.5 Exatidão e Precisão	30
2.8.6 Sensibilidade	31
2.8.7 Limite de detecção	31
2.8.8 Limite de quantificação	31
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	33
3.1 MATERIAIS	33
3.1.1 Amostras	33
3.1.2 Reagentes, Solventes e Consumíveis	34
3.1.3 Preparo de Soluções	35
3.1.3.1 Soluções padrão e fases móveis	35
Solução padrão estoque de cloranfenicol	35

Solução de trabalho cloranfenicol	35
Solução padrão estoque de D5-cloranfenicol	35
Solução de trabalho D5-cloranfenicol	35
Fases móveis (FM)	35
<b>3.2 MÉTODOS</b>	<b>36</b>
3.2.1 Fortificação das amostras	36
3.2.2 Extração	36
3.2.3 Separação, detecção e equipamentos	37
3.2.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência	38
3.2.3.2 Espectrometria de massas	38
3.2.4 Validação do método para determinação de cloranfenicol	40
3.2.4.1 Linearidade	40
3.2.4.2 Seletividade e efeito matriz	41
3.2.4.3 Precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação	41
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
4.1 CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO	44
4.1.1 Extração	44
4.1.2 Separação por HPLC	44
4.2 OTIMIZAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS	45
4.3 VALIDAÇÃO: MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE CLORANFENICOL	46
4.3.1 Linearidade	46
4.3.2 Seletividade e efeito de matriz	48
4.3.3 Precisão e exatidão	51
4.3.4 Limites de quantificação e detecção	52
4.4 AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS ALEATÓRIAS DE PESCADO	53
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>56</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>57</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Para a dieta humana, o peixe constitui uma fonte de proteínas de alta qualidade, de vitaminas A, D, E e complexo B e de certos minerais, dentre os quais cálcio, fósforo e ferro. Em sua fração lipídica os peixes contêm ácidos graxos ômega-3, os quais são denominados essenciais por não serem sintetizados pelo organismo, e que contribuem positivamente com a bioquímica de membranas celulares, funções cerebrais, e transmissão de impulsos nervosos e funções circulatórias (MARTIN et al., 2006; BAYLISS, 1996)

O potencial pesqueiro do Brasil caracteriza-se pela grande extensão costeira e o excepcional volume de águas interiores, com significativa diversidade de espécies de valor comercial relevante, o que vem proporcionando expressivo crescimento da aquicultura, tanto marinha como de águas interiores, e conquistando progressivamente os mercados, nacional e internacional (HIGIENE ALIMENTAR, 2008; MPA, 2010).

A aquicultura pode ser definida como o processo de produção em cativeiro, de organismos com habitat predominantemente aquático, tais como peixes, camarões, rãs, entre outras espécies (PESCA BRASIL, 2008). Esse tipo de processo produtivo vem se impondo mundialmente como atividade pecuária. O Brasil apresenta um grande potencial para desenvolvimento da aquicultura, além de mão-de-obra abundante e crescente demanda por pescado. Em 2008 o país já apresentava índices anuais de crescimento de 9,2% comparados com apenas 1,4% na pesca extrativa e 2,8% na produção de animais terrestres. Volumes de produção para este mesmo ano foram registrados próximos a 365.360 t. Em 2009 registrou-se volume produtivo na ordem de 415.649 toneladas e, em 2010, 479.398 toneladas. Ainda para 2010, a aquicultura continental apresentou volume de produção na ordem de 394.340 toneladas, das quais 63,4% foram representados pela soma de tilápia e carpa (BRASIL, 2012a; FAO, 2008; MERCADO DA PESCA, 2008).

A balança comercial brasileira de peixes criados em cativeiro apresentou, no ano de 2009 e 2010, exportações na ordem de US\$ 247 milhões e US\$ 263 milhões, respectivamente, com destaque crescente para peixes frescos, principalmente na forma de filés. Verificaram-se valorizações do preço de pescado exportado pelo Brasil, também gerado diretamente por crescimento de índices de vendas de preparações e conservas, lagosta, polvo e de atuns e afins para mercados externos (BRASIL, 2012a; SEAP, 2008).

O emprego de antimicrobianos se tornou imperioso na aquicultura, como forma de minimizar perdas de produtividade decorrentes de doenças infecciosas. Os antimicrobianos na produção animal visam essencialmente aspectos profiláticos e de tratamento de afecções (JORNAL DA UNICAMP, 2008). Nestes casos, seu uso é permitido com base nas legislações da ANVISA e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2010).

Usos indevidos de antibióticos tendem a contribuir para que produtos alimentícios de origem animal apresentem resíduos em níveis que podem comprometer a saúde do consumidor. Além disso, no local de produção, podem contribuir para a manutenção de ciclos de seleção de bactérias resistentes, também, com diminuição inerente de eficácia de medicamentos. Neste contexto, se fazem presentes questões de segurança alimentar e resistência bacteriana (JORNAL DA UNICAMP, 2008).

Resíduos de drogas veterinárias em alimentos são avaliados e comparados com os limites máximos de resíduos (LMR) permitidos por legislações vigentes. No Brasil, estabelecer limites máximos de resíduos é competência do Ministério da Saúde. No caso de seu não estabelecimento, fazem-se uso de limites internalizados no Mercosul, bem como os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, constantes nas Diretivas da União Européia e utilizados pelo FDA/USA (BRASIL, 2010).

Cloranfenicol – CAP é um antibiótico de largo espectro antibacteriano e propriedades farmacocinéticas. Seu uso tem sido frequentemente associado a desordens sanguíneas, algumas fatais, e não dose-dependente (GUY et al., 2004). É vetado na União Européia, Estados Unidos e, dentre outros países, o Canadá, para animais destinados ao consumo humano (OLVEIRA et al., 2007; FERGUSON et al., 2005).

A qualidade dos produtos exportados pelo Brasil para a Europa tem sido o fator determinante no estabelecimento de barreiras à exportação do pescado brasileiro. O regulamento adotado pela União Européia exige certificados de testes laboratoriais para constatar os níveis de metais pesados, antibióticos e histamina aos exportadores de peixe fresco, substâncias estas relacionadas à segurança do consumidor (SEAP, 2008).

A absoluta necessidade de atendimento às exigências sanitárias de importantes mercados internacionais, como Estados Unidos da América, União Européia, China e Japão, bem como a preocupação a nível nacional, determinou o estabelecimento de uma política de proteção à saúde do consumidor no que diz respeito à presença de resíduos nos produtos da pesca, através da implementação de um Programa como instrumento

normativo disciplinar, inicialmente denominado Plano Nacional de Controle de Resíduos – PNCR (HIGIENE ALIMENTAR, 2008).

Hoje o Programa tem seu nome estendido para Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC. Sendo um programa federal de inspeção e fiscalização de alimentos, se baseia em análise de risco, e visa verificar a presença de resíduos de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde do consumidor, como resíduos de medicamentos veterinários, de agrotóxicos ou afins, de contaminantes ambientais e de contaminantes inorgânicos, fornecendo aporte de um sistema que garanta a segurança e a inocuidade dos alimentos disponibilizados aos consumidores e que seja equivalente aos requisitos sanitários internacionais estabelecidos pelo MERCOSUL, CODEX, OMC, e órgãos auxiliares como FAO, OIE, WHO (BRASIL, 2012b).

Devido às exigências de análises de resíduos de antibióticos pela União Européia aos exportadores de pescado, estas necessitam ser realizadas em um período curto, já que os peixes não podem ser liberados para exportação até que sejam obtidos laudos analíticos que comprovem a adequação do produto às exigências de seu destino. Portanto, vê-se a necessidade do desenvolvimento de métodos que sejam efetivos e rápidos, e preferivelmente multi-elementares, para análises de antibióticos em pescado.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo geral desenvolver e validar uma metodologia para a análise de resíduos de cloranfenicol em pescado. Os objetivos específicos foram: (i) comparar diferentes métodos de extração comumente empregados para determinação de cloranfenicol em pescado; (ii) desenvolver um método por CLAE-EM/EM para determinação de cloranfenicol em pescado; (iii) validar o método de acordo com parâmetros de desempenho de linearidade, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação; (iv) avaliar criticamente a iminência da aplicação do método desenvolvido, para avaliação comercial de pescado.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PEIXES

Peixe fresco é aquele que não sofreu qualquer processo de conservação, exceto pelo resfriamento, e que mantém suas características sensoriais essenciais inalteradas (SÃO PAULO, 1978). Neste estágio, deve apresentar integridade física, refletida por aspecto geral sem alterações, mutilações, deformações e traumas, livre de parasitas e doenças microbianas (NUNES, 1994). Também importante, deve apresentar vísceras íntegras e diferenciadas, bem como musculatura da parede intestinal sem sinais de autólise, odor e sabor inalterados (IAL, 1985).

Em função do pH próximo à neutralidade, da elevada atividade de água nos tecidos, da alta disponibilidade de nutrientes e lipídeos insaturados, bem como da presença de enzimas de rápida ação destrutiva em seus tecidos naturais, os peixes, como produto de origem animal, apresentam elevada susceptibilidade à deterioração (SASSAKI & RIBEIRO, 1991; ASHIE et al., 1996; ABABOUCHE et al., 1991).

Após a captura, o peixe passa pelos seguintes estágios: hiperemia e/ou liberação do muco, *rigor mortis*, digestão química, autólise e decomposição bacteriana. A liberação do muco ocorre como uma reação peculiar do organismo agonizante ao meio ambiente adverso. Tal muco, constituído principalmente pela mucina, é um excelente substrato para o desenvolvimento de bactérias, devendo ser retirado por lavagem simples (BERAQUET & LINDO, 1985; ASHIE et al., 1996; CHAGAS, 2010; DA SILVA, 2008).

O *rigor mortis* ou rigidez cadavérica se instala após a morte. Métodos de captura têm influência acentuada no intervalo de tempo necessário para que tal *rigor mortis* se instale. Pescados submetidos a elevados níveis de estresse durante o processo de captura apresentam reduzidos períodos de *rigor mortis* em função de gasto excessivo de glicogênio (VIEIRA, 2004). No *post rigor*, os músculos amolecem, tem-se o desdobramento da adenosina-trifosfato (ATP) e formação de amônia e demais compostos voláteis a partir da uréia. O pH do músculo aumenta até alcançar os valores iniciais (ASHIE et al., 1996).

De forma geral, a glicogenólise não é tão intensa em peixes, resultando em pH entre 5,4 e 6,2. Estes valores, além de insuficientes para inibir desenvolvimento de

microrganismos, são ideais para a ativação de enzimas proteolíticas naturalmente presentes nos tecidos (catepsinas). Tais enzimas, potencializadas pela atividade de enzimas de mesma natureza e provenientes de bactérias, podem favorecer contaminações por transposição de paredes do intestino por bactérias também intestinais (JAY, 2005).

Algumas práticas de manuseio pós-captura recomendadas para assegurar menores riscos bacteriológicos são: sangria, evisceração, lavagem, resfriamento, acondicionamento e sanitização (VIEIRA, 2004).

No sentido da conservação, o trinômio tempo x higiene x temperatura se faz essencial para assegurar atributos de qualidade de pescados. Tempo se relaciona com a rapidez com que se desencadeiam reações autolíticas e/ou bacterianas que, por outro lado, estão relacionadas com o grau de higiene do barco e dos manipuladores do pescado (VIEIRA, 2004).

Quanto mais baixas forem as temperaturas aplicadas no sentido da conservação do pescado, mais lentas tendem a ser as deteriorações tanto bacterianas quanto enzimáticas. Para tanto, são comuns os usos câmaras de refrigeração ou gelo em escamas e cubos. O tratamento e filtração da água utilizada na fabricação deste gelo, bem como na lavagem do pescado, são de suma importância. Outros cuidados básicos na pós captura incluem o correto empilhamento evitando esmagamento, a eliminação de detritos, a higienização de equipamentos e locais físicos, a higiene e saúde do manipulador (HATHCOCK, 1982; LUCAS, 1995; PANETTA et al., 1995).

Também o *rigor mortis* sofre influência de baixas temperaturas, demorando mais para se iniciar e se tornando mais prolongado. Como conseqüência, há o adiamento de deteriorações que possam ser causadas por bactérias presentes ao longo deste estágio. Assim, a conservação e adequada estocagem do pescado se fazem de grande importância não só imediatamente após a captura, mas ao longo das etapas que a procedem, tais quais: transporte, comercialização e processamento industrial (VIEIRA, 2004).

Considerando o fato de cargas microbiológicas em pescados apresentarem relação direta com o tipo e natureza do habitat aquático do qual o peixe provem, se faz relevante ressaltar que recorre-se à administração de antibióticos em ambientes potencialmente comprometidos. Isto, considerando inclusive o fato de altas cargas poderem determinar

quebras significativas de produção e rentabilidade da exploração destes animais como produto (TAYLOR, 1985; SAAVEDRA et al., 2004).

Embora os peixes sejam fontes de nutrientes de elevada qualidade, é em função dos riscos eminentes, de natureza biológica (bactérias, vírus e parasitas) e também de natureza química (toxinas, resíduos e contaminantes), que se percebem preocupações atreladas à segurança e ao consumo de pescado fresco. Os efetivos cuidados e controles de qualidade no manejo se traduzem, portanto, na redução de problemas de ordens ambientais e de saúde pública (HUSS et al., 2000).

### 2.1.1 Tilápia

A tilápia *Oreochromis niloticus* é um peixe de escamas, que predomina em águas doces e quentes (20 a 30 °C). Nativo do continente africano e da Anatólia, ou Ásia Menor, foi introduzido no Brasil em meados de 1952. Atualmente, se destaca nacionalmente frente a inúmeras espécies exóticas também introduzidas, tais quais carpas, trutas e *catfish* americano, bem como a espécies originalmente brasileiras (NOGUEIRA et al., 2007).

A primeira espécie de tilápia relatada no Brasil foi a Tilápia do Congo (*Tilapia rendalli*), em 1952. Posteriormente, a espécie Nilótica (*Oreochromis niloticus*), cuja linhagem Chitralada ou Tailandesa foi desenvolvida no Japão e melhorada no Palácio Real de Chitral, na Tailândia, foi introduzida. Isto ocorreu em 1996, tendo seus alevinos sido doados pelo *Asian Institute of Technology* (AIT). Nos últimos anos, tal linhagem vem sofrendo processos de melhoramento genético, e usufruindo de sucesso crescente em vertentes do mercado brasileiro. Na figura 1 pode ser observada uma tilápia da espécie Nilótica (*Oreochromis niloticus*) (GENTELINI, 2007; NOGUEIRA et al., 2007).



**Figura 1.** Tilápia da espécie Nilótica (*Oreochromis niloticus*)

De forma geral, são inúmeras as características que elevam o potencial da tilápia como peixe de cultura: hábito alimentar onívoro além de detritívoro, respondendo com mesma eficiência à ingestão de proteínas de origem vegetal e animal; alimentam-se de itens básicos da cadeia trófica, abrangendo ampla gama de alimentos; resposta positiva à fertilização (adubação) em viveiros; desova ao longo de todo o ano; resistência a superpovoamento e a baixos teores de oxigênio dissolvido. Considerando condições de cultivo próximas ao conforto térmico (28°C), é um animal de crescimento acelerado e curto ciclo de engorda – aproximadamente seis meses (MARENGONI, 2006; ZIMMERMANN e HASPER, 2003; SEBRAE, 2008; HEIN & BRIANESE, 2004).

Em função de apresentar reprodução relativamente precoce, a partir de quatro meses de idade, o risco de superpovoamento de tanques é eminente. Assim sendo, o contorno desta situação se faz possível, por exemplo, por meio da manutenção de populações de alevinos exclusivamente machos, sexuados manualmente ou revertidos através de hormônios sexuais (SEBRAE, 2008).

Altas densidades de estocagem determinam maiores produções e conseqüente retorno mais expressivo sobre investimentos. Ao mesmo tempo, tais densidades elevadas imputam condições de crescimento conturbadas, se comparadas às condições da natureza. Nestes casos, o estresse inerente ao meio tende a culminar em maior suscetibilidade dos animais a quadros infecciosos (MARENGONI, 2006).

Produções eficientes não significam necessariamente obtenção de pesos máximos passíveis de serem obtidos, mas pesos que podem ser atingidos com baixas conversões alimentares, em períodos razoavelmente curtos, e com aceitação comercial (MARENGONI, 2006)

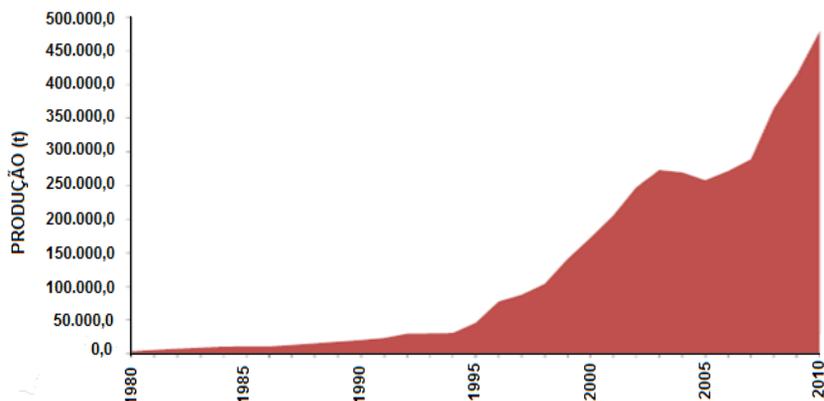
Além da elevada taxa de adaptabilidade às condições variadas e regionais de cultivo, as características organolépticas e nutricionais são fatores que vieram a concorrer para o destaque nacional da tilápia como peixe de cultura. Sua carne é tida como saborosa e apresenta baixo teor de gordura (média de 0,9 g/100 g de carne) e de calorias (aproximadamente 172 kcal/100g de carne), além da ausência de espinhas em forma de “Y” (mioceptos), o que culmina em rendimentos aproximados a 33% a 37% de filés, para exemplares com peso médio de 600 gramas, o que a potencializa inclusive como peixe para industrialização. Tilapicultura já é termo corrente entre pesquisadores (NOGUEIRA et al., 2007; SEBRAE, 2008).

## 2.2 PESCA EXTRATIVA, AQUICULTURA E PSICULTURA

Pesca extrativa é a atividade relacionada à retirada de organismos aquáticos da natureza sem seu prévio cultivo. Pode ocorrer em escala industrial ou artesanal, tanto no mar como no continente. Em função disso, a atividade extrativista tem sido controlada em boa parte do planeta como tentativa de se evitar maiores desastres ecológicos do que os já presentes (SEBRAE, 2008).

A aquicultura abrange o cultivo de organismos aquáticos, de forma racional, em ambiente marinho de água doce ou salobra, em território marítimo ou continental. A produção aquícola brasileira teve início em 1968, quando o volume de produção reportado foi menor que 0,5 toneladas. Desde então, a aquicultura nacional tem mostrado um crescimento gradual, em certos momentos exponencial. Segundo a Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP), no período de 1992 a 2002, o crescimento de 825% da aquicultura nacional sobrepôs os 142% da aquicultura mundial. Em 2003 a produção nacional foi igual a 273.268 toneladas (SIMÕES et al., 2007; BOSCARDIN-BORGHETTI et al., 2003; GENTELINI, 2007).

Nos anos 2004 e 2005 observou-se pequena queda na produção de tilápia, com posterior retomada de crescimento. Em 2008, 2009 e 2010, registraram-se produções iguais a 365.367 t, 415.649 t e 479.398 t, respectivamente. O Brasil ocupa atualmente a 17ª posição no ranking mundial, e 2ª posição no ranking sul-americano, atrás apenas do Chile (881.084 toneladas). A China vem se mantendo como o maior produtor mundial, com volumes produtivos próximos a 45,3 milhões de toneladas/ano. Na Figura 2 é possível visualizar graficamente a evolução da produção de pescado nacional, somadas aquicultura marinha e continental, no período de 1980 a 2010 (MPA, 2010).



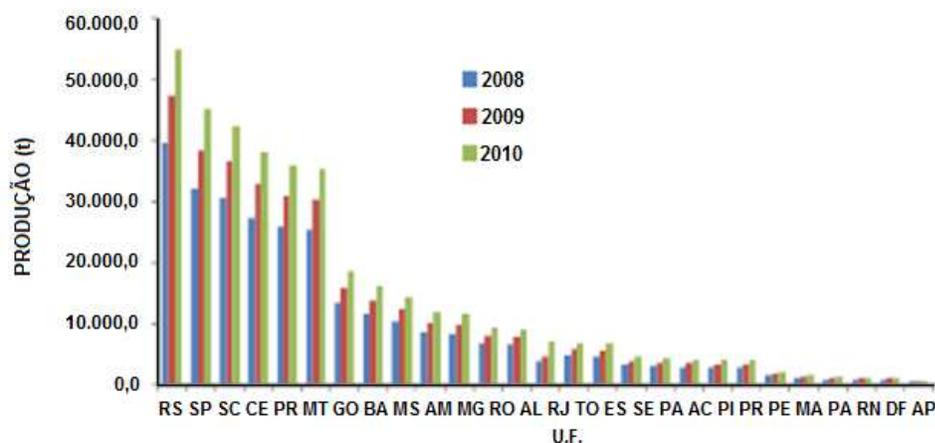
**Figura 2:** Evolução da produção aquícola nacional (t) de 1980 a 2010 (IBAMA, 2001; CRESCÊNIO, 2005; MPA, 2010)

O crescimento do setor aquícola no país é evidente. Em 2010, a produção nacional apresentou o incremento de 15,3% em relação à produção de 2009 e de 31,2% durante o triênio 2008-2010. A Tabela 1 representa um quadro comparativo entre a produção total, continental e marinha da aquicultura no Brasil, entre os anos 2008 e 2010. A Figura 3 discrimina produções aquícolas continentais, por unidades de Federação, para o mesmo período (MPA, 2010).

**Tabela 1:** Produção total, continental e marinha, da aquicultura no Brasil (2008 a 2010).

ANO		PRODUÇÃO		
		Total	Continental	Marinha
2008	toneladas	365.366,4	282.008,1	83.358,3
	%	100	77,2	22,8
2009	toneladas	415.649,4	337.352,2	78.296,4
	%	100	81,2	18,8
2010	toneladas	479.398,6	394.340,0	85.058,6
	%	100	82,3	17,7

Fonte: MPA (2010)



**Figura 3.** Produções aquícolas continentais (t), por unidades de Federação (MPA, 2010)

A referida piscicultura é um segmento dentro da aquicultura correspondente ao cultivo de peixes, que remonta a civilizações antigas, como a dos egípcios (GENTELINI, 2007). No Brasil, a atividade teve início a partir da colonização dos holandeses no Nordeste do século XVII. Os cultivos eram desenvolvidos em zonas litorâneas, em viveiros rústicos abastecidos pelas marés, em regimes totalmente extensivos de cultivo e foram entre as décadas de 30 e 40 que se introduziram as espécies de grande expressão em cultivo (BOSCARDIN-BORGHETTI et al., 2003).

No início da década de 2000, a piscicultura já contribuía com índices superiores a 67% do volume total produzido pela aquicultura nacional (SIMÕES et al., 2007). Atualmente, a maior parcela da produção aquícola é oriunda da aquicultura continental, na qual a piscicultura já representa cerca de 80% da produção total (CEDAP, 2011).

O Brasil, além de possuir um dos maiores potenciais hídricos do mundo, é considerado o país com maior potencial de produção de tilápias em complexos aquícolas, devido à grande disponibilidade de áreas propícias e grande abundância em água. Outro fator importante da cadeia, além do rápido crescimento da atividade produtora em si, é a expansão das indústrias e plantas de processamento, visando às exportações principalmente para o mercado americano, tornando, a espécie de grande interesse na aquicultura e piscicultura futuras (NOGUEIRA et al., 2007; GENTELINI, 2007).

Em 2005 a produção de tilápias representava cerca de 37% das 179.746,0 toneladas de pescados produzidos em água doce no Brasil (SIMÕES et al., 2007).

Em 2010, seguindo o padrão de anos anteriores, a tilápia e a carpa se apresentaram como espécies mais cultivadas e, somadas, representaram 63,4% da produção nacional aquícola continental. A evolução da produção da modalidade, ao longo dos anos 2008, 2009 e 2010, pode ser observada, por espécie de peixe, na tabela a seguir.

**Tabela 2:** Produção aquícola continental, por espécie (2008 a 2010)

ESPÉCIE	PRODUÇÃO		
	2008	2009	2010
TILÁPIA	111.145,3	132.958,3	155.450,8
CARPA	67.624,2	80.895,5	94.579,0
TAMBAQUI	38.833,0	46.454,1	54.313,1
TAMBACU	15.459,0	18.492,8	21.621,4
PACU	15.190,0	18.171,0	21.245,1
PIAU	5.227,0	6.252,0	7.227,6
CURIMATÃ	3.736,5	4.469,9	5.226,0
TRUTA	3.662,6	4.381,4	5.122,7
TAMBATINGA	3.514,6	4.204,3	4.915,6
BAGRE	2.912,5	3.484,1	4.073,4
PINTADO	1.777,8	2.126,7	2.486,5
OUTROS	12.925,60	18.947,00	18.078,80
<b>TOTAL</b>	<b>282.008,1</b>	<b>337.353,0</b>	<b>394.340,0</b>

Fonte: MPA (2010)

Dentre os principais nichos produtivos das tilápias, destacam-se: tilápia viva, destinada ao mercado vivo e a pesque-pagues; filés, destinados a mercados internos, tais quais frigoríficos e restaurantes; tilápias inteiras, evisceradas e filés de peixes frescos e congelados, destinados à exportação (NOGUEIRA et al., 2007).

Dados da Balança Comercial de Pescados, baseado em filés de tilápias congelados, tilápias inteiras frescas e congeladas, apontam que em 2006 o volume de exportação do produto se aproximou 165 t. Em comparação ao ano anterior, quando foram registradas 314,8 t., houve queda de 47%, possivelmente decorrente de câmbio desfavorável e crescente competitividade dos produtos da China. Neste período, os principais mercados de destino em 2005 foram EUA, Reino Unido e França (SEBRAE, 2008).

Volumes de exportação de pescados brasileiros se aproximaram de US\$ 263 milhões no ano 2010. A Tabela 3 apresenta um comparativo dos anos 2009 e 2010 dos principais destinos destes produtos brasileiros, em função do valor (MPA, 2010).

**Tabela 3:** Principais destinos do pescado brasileiro

PAÍSES	2009		2010		Incremento (+) Redução (-)	
	US\$	Kg	US\$	Kg	US\$	Kg
<b>Estados Unidos</b>	72.887.602	7.134.421	109.219.507	8.328.804	+50%	+17%
<b>Espanha</b>	21.182.287	4.727.954	19.465.169	5.424.064	-8%	+15%
<b>França</b>	29.000.483	6.321.888	17.734.454	2.896.656	-39%	-54%
<b>Hong Kong</b>	12.683.342	913.953	14.688.759	1.110.561	+16%	+22%
<b>Holanda</b>	8.717.617	746.269	11.877.729	883.425	+36%	+18%
<b>Japão</b>	12.683.271	630.145	11.155.471	665.771	-12%	+6%
<b>China</b>	8.165.207	1.028.270	9.446.834	1.119.897	+16%	+9%
<b>Total</b>	<b>165.319.809</b>	<b>21.502.900</b>	<b>193.587.923</b>	<b>20.429.178</b>	<b>+17%</b>	<b>-5%</b>

Fonte: MPA (2010)

O desenvolvimento da piscicultura está possibilitando ampliar a produção mundial de pescado. Por outro lado, de acordo com BASTIAN (1991), é uma atividade causadora de potencial degradação ambiental. No Brasil, já começam a surgir alguns casos isolados para os quais a implantação de unidades de piscicultura encontra dificuldades junto aos

órgãos ambientais, inclusive com a proibição de sua instalação, devido à qualidade do efluente produzido pelo cultivo.

### **2.2.1 Piscicultura e meio ambiente**

O rápido crescimento da atividade aquícola em nível mundial, baseado em modelos intensivos de produção, com utilização expressiva de insumos e fontes energéticas, gera riscos ao meio ambiente, podendo ser, em curto prazo, responsável por um desenvolvimento insustentável da atividade (FAO, 2008).

O impacto causado ao meio ambiente varia de acordo com o sistema de cultivo e com as características dos corpos d'água que recebem os efluentes. Os empreendimentos são totalmente dependentes da quantidade e qualidade da água disponível, bem como das práticas de manejo desta água e da capacidade de assimilação do ambiente aquático e terrestre circundantes (ZANIBONI FILHO, 1997; TACON & FOSTER, 2003).

Existe uma convergência de interesses dos aquicultores e dos governos em minimizar a quantidade de resíduos em efluentes aquícolas. Isto, baseado no fato de resíduos representarem custos para o produtor (na medida em que são insumos não convertidos) ao mesmo tempo em que, como já dito, são fontes potencialmente poluentes e, por isto, passíveis de controle por órgãos públicos de defesa do meio ambiente (NACA/FAO, 2000).

Segundo CYRINO e colaboradores (2005), impactos ambientais causados pela piscicultura e práticas de manejo de peixes atrai a atenção da comunidade acadêmica e do setor produtivo há mais de duas décadas. De maneira geral, tais impactos se relacionam ao fato de os responsáveis pelos sistemas de cultivo, na sua grande maioria, disporem os efluentes produzidos, em corpos receptores, sem que haja tratamento prévio (SIMÕES et al., 2007; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2002).

Neste sentido, propôs-se o código de Boas Práticas de Manejo (*Best Management Practices*), com a finalidade de reduzir o volume e melhorar a qualidade do efluente de tanques de produção, melhorando a qualidade de água e reduzindo as cargas poluentes nos corpos de águas naturais circunvizinhos, a utilização de plantas aquáticas na redução de cargas do efluente, dentre outras (BOYD, 2003; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2003).

Alimentos não consumidos e fezes dos peixes têm elevada contribuição para deterioração da qualidade de águas, em função de acúmulo de matéria orgânica. Adições

de ração ocorrem diariamente. Atenções são levantadas para a presença elevada de elementos como o fósforo e o nitrogênio, em cursos d'água (ARANA, 1999; SIMÕES et al., 2007).

A fertilização também responde como um fator deteriorador da qualidade de efluentes gerados na piscicultura. Orgânico ou inorgânico, se faz de grande importância o monitoramento do processo por meio das quantidades administradas à população cultivada, com suspensão para biomassas excedentes a três toneladas por hectare (CRESCÊNIO, 2005).

No conceito epidemiológico, a intensificação da atividade também contribui para um ambiente no qual o aparecimento e disseminação de doenças e infecções se tornam facilitados. Neste sentido, reflexos podem ser observados quanto ao interesse crescente pelo uso de vacinas e antibióticos, os quais, dependendo do emprego e também da forma de administração, contribuem com maior ou menor impacto na composição dos efluentes gerados (SUMAGAYSAY-CHAVOSO et al., 2003; TAYLOR, 1985; SAAVEDRA et al., 2004).

## **2.3 EMPREGO DE ANTIBIÓTICOS NA PRODUÇÃO ANIMAL**

Antibióticos são substâncias que inibem o crescimento de bactérias e de microrganismos, interferindo em funções metabólicas essenciais. Surgiram na década de 50, e sua contribuição marcante foi na redução do número de pessoas que sofriam ou morriam de enfermidades causadas por infecções bacterianas (GRANJA, 2004).

Assim que os antibióticos tornaram-se disponíveis para o tratamento de doenças bacterianas em humanos, foram introduzidos também na prática terapêutica veterinária. Antes e após a Segunda Guerra Mundial, infusões de penicilinas em solução salina eram usadas para tratar mastite em rebanhos leiteiros. Nesse mesmo período, produtos injetáveis também foram disponibilizados para animais de companhia e de produção, sendo que várias formulações de estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, penicilinas e sulfas foram fabricadas apropriadamente para o uso veterinário (GUSTAFSON, 1991).

Drogas antimicrobianas são consideradas ferramentas de elevada relevância no controle e erradicação das enfermidades infecciosas de origem bacteriana em animais de produção (MARTIN & MORAGA, 1996). São administradas aos animais por várias vias,

sendo as principais as vias intramuscular, intravenosa, subcutânea, banhos, oral e infusões. Injeções constituem as formas mais laboriosas (MITCHELL et al., 1998; MCEVOY et al., 2000).

Antibióticos são comumente utilizados na agricultura como aditivos alimentares e também como agentes profiláticos e terapêuticos para evitar e curar doenças em animais (GIKAS et al., 2004). Como aditivos, podem ser incorporadas à ração, sem finalidade nutritiva, com o objetivo de aumentar a produtividade, diminuir a mortalidade, prevenir infecções e impedir a deterioração da própria ração (PALERMO-NETO, 2001). Segundo GRANJA (2004), dos antibióticos empregados na produção animal, aproximadamente 50% são de uso exclusivo em medicina veterinária, os quais necessitam de aprovação por órgãos oficiais anteriormente ao seu uso.

Para administração de antibióticos para animais em cultivos fazem-se necessárias várias informações acerca da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os agentes patogênicos, do tempo de depleção da droga no animal cultivado visando à segurança alimentar e do conhecimento dos efeitos diversos e adversos sobre o ambiente (OLIVEIRA, 2008).

Cerca de 87% dos antibióticos veterinários são administrados com fins de tratamento ou profilaxia, controle e prevenção. Outros 13% são usados para o aumento da eficácia nutricional, com o ganho de peso como indicador de resposta. Essa prática é proibida no Brasil e em muitos outros países (GRANJA, 2004).

Como já mencionado, ambientes de cultivo intensivo imputam condições de crescimento com níveis de estresse animal elevado se comparado à natureza. Por este motivo, estes ambientes são também mais suscetíveis a ocorrências de quadros infecciosos. Para a piscicultura, as características físicas e químicas do meio aquático ainda se apresentam como agravante quanto à disseminação de doenças e infecções (MARENGONI, 2006).

No sentido da descoberta da aplicação de antibióticos para combate a doenças e infecções, bem como para promoção do crescimento, criadores de animais para fins alimentares humanos, dentre os quais os piscicultores, passaram a administrar tais medicamentos para as culturas, de forma indiscriminada. Paralelamente à sua introdução na prática veterinária, iniciou-se uma investigação a respeito dos efeitos adversos provocados pela presença desses fármacos nos produtos destinados ao consumo humano (SERRANO, 2005; BERRIDGE, 1956).

A Tabela 4 apresenta uma relação de antibióticos banidos para uso em animais destinados ao consumo humano, e de antibióticos não mais disponíveis para uso veterinário. A Tabela 5 apresenta uma relação de antibióticos usados na aquicultura de certos países.

**Tabela 4:** Relação de antibióticos para uso veterinário

<b>ANTIBIÓTICOS BANIDOS PARA ANIMAIS DESTINADOS AO CONSUMO HUMANO</b>		
<b>ANTIBIÓTICO</b>	<b>PAÍS</b>	<b>RAZÃO</b>
Spectinomycin	USA	Desenvolve resistência bacteriana
Enfloxacin	USA	Desenvolve resistência bacteriana (quinolona)
Cloranfenicol	Argentina, Canadá, EU, Japão, USA	Induz anemia aplástica em humanos
Firampin	Sem registro nos USA ou Canadá para uso em animais	Tumorigenicidade e teraogenicidade em animais experimentais
<b>ANTIBIÓTICOS NÃO MAIS DISPONÍVEIS PARA FINS VETERINÁRIOS</b>		
<b>ANTIBIÓTICO</b>	<b>INDICAÇÃO</b>	<b>ALTERNATIVAS</b>
Cefuroxina	Tratamento de mastites clínicas, tratamentos de infecções subclínicas	Existem inúmeros medicamentos disponíveis contra mastites
Cloranfenicol	Tratamento de infecções bacterianas (amplo espectro)	Tianfenicol, Florfenicol, Amoxilina
Polymixin B Sulfate	Tratamento de mastites clínicas causadas por bactérias Gran (-)	Existem inúmeros medicamentos disponíveis contra mastites desta natureza
Nystatin	Tratamento de Candidíase	Natamycin

Fonte: SERRANO (2005)

**Tabela 5:** Relação de antibióticos usados na aquicultura de certos países.

<b>PAÍS</b>	<b>ANTIBIÓTICO</b>	<b>INDICAÇÃO</b>
Reino Unido	oxitetraciclina, ácido oxolínico, amoxilina, co-trimazina (trimethoprim-sulfadiazina)	Não mencionada
Noruega	Benzilpenicilina + dihidrostrepto-mycin, florfenicol, flumequina, ácido oxolínico, oxitetraciclina, co-trimazina	Não mencionada
Estados Unidos (aprovados pelo FDA)	Sulfadimethoxina e ormethoprim	Controle de furunculose ( <i>Aeromonas salmonicida</i> ) em salmonídeos. Controle de septicemia entérica ( <i>Edwadsiella ictaluri</i> ) em Peixe-gato
Estados Unidos (aprovados pelo FDA)	Oxitetraciclina	Controle de doenças "ulser", furunculoses, septicemia hemorrágica bacterial e <i>Pseudomonas</i> em salmonídeos Controle de septicemia hemorrágica bacterial em Peixe-gato
México	Enrofloxacin, oxitetraciclina	Não Mencionada

Fonte: SERRANO (2005)

### **2.3.1 Consequências do uso antibióticos para a saúde pública**

Em conjunto com melhorias ocorridas para saneamento urbano e qualidade da água, usos e aplicações de antibióticos e vacinas impactaram positivamente na diminuição mundial de mortes por quadros infecciosos. O progresso foi tão notável que, ha três décadas, alguns estudiosos defendiam o fim das doenças infecciosas. Este otimismo, contudo, se mostrou prematuro. Percebe-se atualmente certo agravamento e rápidas disseminações de doenças antigas (SAAVEDRA et al., 2004; SERRANO, 2005).

O uso generalizado de medicamentos veterinários na cadeia produtiva de alimentos derivados de animais representa perigo potencial para saúde humana. Os principais riscos surgem do aumento de resistência bacteriana, e do aparecimento de reações alérgicas a medicamentos, particularmente a antibióticos e resíduos destas bases farmacológicas (GIKAS et al., 2004; FRANCO et al., 1990; WHITE et al., 1993; MITCHELL et al., 1998).

Resistência bacteriana tem se tornado um problema crescente, de ordem clínica, pública, e base global. Esta mesma resistência, contudo, não é induzida de forma direta por antibióticos. Ocorre é a seleção de organismos resistentes, em decorrência da eliminação daqueles sensíveis a medicamentos, com diminuição de barreiras microbiológicas naturais à colonização. A capacidade de transferência de genes entre bactérias também é risco que se faz eminente (CORPET & BRUGERE, 1995).

Tratamentos com antibióticos em cultivos, tais quais piscicultura, são de extrema importância e rápida resposta na prevenção e tratamentos de doenças e infecções bacterianas. No entanto, a administração destes mesmos antibióticos pode ser contraproducente tanto em subdosagens quanto em superdosagens nesta atividade (MENDES et al., 2004).

Os antibióticos pertencem ao grupo das substâncias residuais de maior influência na qualidade de alimentos de origem animal. Eles são os contaminantes mais estudados em todo o mundo e os responsáveis pelas maiores regulamentações internacionais. Suas consequências para a saúde humana são divididas em três aspectos: desenvolvimento de resistência – anteriormente mencionado, indução de alergias, e efeitos tóxicos diretos (MOTA, 2005; OLIVEIRA, 2002).

Por razões comuns às supracitadas, cada vez mais se intensifica o controle e o monitoramento antibióticos em animais destinados ao consumo humano: controle das matérias-primas, dos intermediários, dos princípios ativos das drogas e, finalmente, dos

resíduos que as drogas veterinárias podem deixar nos alimentos. Caso não sejam atendidas as exigências, poderão surgir barreiras não tarifárias ao comércio dos produtos. Estes controles têm condições de seguir a evolução tecnológica da indústria veterinária (GRANJA, 2004).

## **2.4 RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM ALIMENTOS**

Para o *Codex Alimentarius*, resíduos de drogas ou de medicamentos veterinários se caracterizam por suas frações, seus metabólitos, produtos de suas conversões ou reações ou impurezas que permanecem no alimento originário de animais tratados (CODEX, 1993). De acordo com LAWRENCE et al. (1996), resíduos de produtos veterinários se traduzem em substâncias farmacologicamente ativas, excipientes ou produtos de degradação e seus metabólitos que permanecem em gêneros alimentícios, obtidos de animais para os quais tenham sido administrados.

Alimentos contendo resíduos de antibióticos em concentrações críticas podem levar os consumidores a quadros patológicos, além de efeitos de sensibilização. Como exemplos, citam-se a anemia aplástica, causada pela injeção do antibiótico cloranfenicol, já utilizado em piscicultura, e os efeitos carcinogênicos e mutagênicos, atribuídos a compostos tais quais os nitrofuranos, e comprovados por meio de testes genotóxicos em animais (MILHAUD & PERSON, 1981; COSTA, 1996; MARTIN & MORAGA, 1996).

Debates na comunidade científica quanto a validade dos efeitos e ameaças à saúde pública, relacionados à resíduos em alimentos, já antecederam 40 anos da publicação de MITCHELL et al. (1998).

Retomando o exemplo da anemia aplástica, o fato de a frequência da aparição dos sintomas em humanos não apresentarem relação com a dose, e de a enfermidade manifestar-se especialmente em indivíduos expostos à droga em mais de uma ocasião, tem motivado países como Estados Unidos, Canadá, da União Européia e o Brasil a proibir ou restringir o emprego de cloranfenicol em animais destinados ao consumo humano, com penalidades a produtores que não acatarem o prescrito (MARTIN & MORAGA, 1996).

Para proteger a saúde humana dos resíduos nocivos de antibióticos, a União Européia, por meio do Regulamento (CEE) nº 2377/90, do Conselho, de 26 de Junho de

1990, e seus anexos, prevê um processo comunitário que estabelece Limites Máximos de Resíduos (LMR) provenientes de medicamentos veterinários, em alimentos de origem animal, para substâncias autorizadas para uso veterinário com destino alimentar humano. O regulamento inclui a discriminação de substâncias que requerem LMR, além de substâncias que não requerem LMR, substâncias banidas sem LMR e substâncias ainda em estudo (GIKAS et al., 2004; CEE, 1990; CORPET & BRUGERE, 1995).

Para antibióticos, dentre os quais cloranfenicol, estes Limites são fixados tendo como base estudos toxicológicos específicos e exames exaustivos de interação, exposição, metabolismo e cinética de eliminação de resíduos. São levados em consideração, por exemplo, toxicidade, potencialidade para mutagenicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade, imunopatologia e indução de hipersensibilidade (FITZPATRICK et al., 1996; MITCHELL et al., 1998; CONCORDET & TOUTAIN, 1997; POTT, 2000; BRITO, 2000).

A aproximação padrão para garantir a segurança da ingestão de contaminantes químicos em gêneros alimentícios é denominada Ingestão Diária Aceitável (IDA), a qual se traduz na dose diária a qual, se ingerida durante toda a vida, não oferece risco apreciável ou efeitos deletérios à saúde vital. Basicamente, é determinada por observação de determinado nível de dosagem (mg/kg ou ppm) e bases toxicológicas de bioensaios (MITCHELL et al., 1998; WOODWARD, 1998; BRITO, 2000; WOODWARD, 1998).

O risco da presença de resíduos tem levado países e blocos econômicos a estabelecerem legislações sanitárias que regulem e normalizem o uso de antibióticos em animais de produção, controlando os níveis de tolerância para alimentos de origem animal (MARTIN & MORAGA, 1996; FAURE, 1998). Dentre tais países incluem-se importantes importadores de produtos brasileiros, os quais consideram resultados de testes de detecção de resíduos como pré-requisitos à liberação da entrada destes mesmos produtos em seus mercados (LAWRENCE et al., 1996).

São várias as organizações nacionais e internacionais envolvidas no desenvolvimento de mecanismos de controle e monitoramento de resíduos provenientes de drogas veterinárias administradas na produção animal. Nestes âmbitos, incluem-se: fiscalização quanto à distribuição, ao uso, à presença, metodologias e tecnologias analíticas empregadas para detecção e determinação em matrizes diversas, e mesmo determinação de limites aceitáveis e proibição em alimentos determinados. No âmbito internacional essas organizações incluem, por exemplo, o Codex Comittee on Residues of

Veterinary Drugs in Food – CCRVDF, baseado no comitê científico do Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives – JECFA (MITCHELL et al., 1998).

A União Européia exige a implantação de planos de monitoramento de resíduos de drogas veterinárias nos países membros do grupo, se fazendo valer, inclusive, de sistemas de alertas rápidos cuja finalidade é informar ocorrências de resíduos potencialmente prejudiciais de alimentos provenientes de países em desenvolvimento, importados pelo bloco europeu (GRANJA, 2004).

Órgãos internacionais e nacionais como o FDA dos Estados Unidos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária e o Ministério Saúde, no Brasil, analisam resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, usando como referência os valores de LMR e períodos de carência fixados e estipulados pelo *Codex* ou estabelecendo outros, quando se fazem valer justificativa (CONCORDET & TOUAIN, 1997; BRASIL, 1999; FISCH, 2000; PALERMO-NETO, 2001).

## **2.5 CONTROLE DE RESÍDUOS NO BRASIL**

A necessidade de atendimento a exigências sanitárias impostas por importadores de produtos brasileiros, tais quais Estados Unidos da América, União Européia, China e Japão, é iminente. Isto, somado à preocupação interna, determinou o estabelecimento de uma política de proteção à saúde do consumidor brasileiro quanto à presença de resíduos em produtos alimentícios de origem animal (HIGIENE ALIMENTAR, 2008).

Visando fortalecer mecanismos de controle sanitário, e complementar ações do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), no âmbito da produção primária de alimentos, a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) instituiu, por meio da Resolução RDC n. 253, de 16 de setembro de 2003, o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet). Inicialmente restrito à matriz leite bovino, a consolidação e ampliação do Programa tem se mostrado contínua para análises de risco em demais produtos alimentícios prontos para o consumo (BRASIL, 2003; BRASIL, 2009; BRASIL, 2010).

Em 1979, foi criado pelo Ministério da Agricultura o Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Carne, o PNCRBC (Portaria Ministerial número 86 de 26/01/1979), que tinha como finalidade sistematizar o controle de resíduos em produtos

cárneos. O programa visava a obtenção de informações sobre a ocorrência dos diversos resíduos em animais abatidos em estabelecimentos sob Inspeção Federal e a distribuição das ocorrências por região de origem dos animais (PORFÍRIO, 1994).

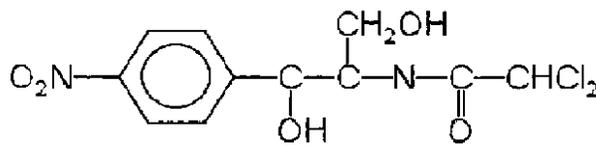
Este programa inicial foi ampliado e, em 1986, o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR) foi instituído, como instrumento normativo disciplinar, visando o controle de resíduos de compostos usados na agropecuária e os poluentes ambientais em carne (BRASIL, 1986), leite, mel, pescado e seus derivados (BRASIL, 1999).

Hoje o Programa tem seu nome estendido para Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC. Sendo um programa federal de inspeção e fiscalização de alimentos, se baseia em análise de risco, e visa verificar a presença de resíduos de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde do consumidor, como resíduos de medicamentos veterinários, de agrotóxicos ou afins, de contaminantes ambientais e de contaminantes inorgânicos, fornecendo garantias de um sistema que provenha a segurança e a inocuidade dos alimentos disponibilizados aos consumidores e que seja equivalente aos requisitos sanitários internacionais estabelecidos pelo MERCOSUL, CODEX, OMC, e órgãos auxiliares como FAO, OIE, WHO (BRASIL, 2012b).

O PNCRC/Animal é composto pelos seus programas setoriais, para o monitoramento em produtos de origem animal (PNCRC/Pescado, PNCRC/Leite, PNCRC/Mel e PNCRC/Ovos) e carnes (PNCRC/Bovinos, PNCRC/Aves, PNCRC/Suínos, PNCRC/Equinos e PNCRC/Avestruz). As diretrizes, programas, planos de trabalho e ações correspondentes constam no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal), instituídas pela Instrução Normativa SDA N.º 42, de 20 de dezembro de 1999. Para o ano de 2011, foi publicada a Instrução Normativa SDA N.º 24, de 09 de agosto de 2011, que aprovou o escopo analítico para o monitoramento dos produtos de origem animal nesse ano, sendo que os resultados do monitoramento de 2011 foram divulgados por meio da Instrução Normativa SDA N.º 07, de 04 de abril de 2012. Especificamente para cloranfenicol em pescado, os resultados do monitoramento do plano nacional foram: para um total de 77 amostras, apenas 1 se caracterizou não conforme, com resultado igual a 75,61µg/Kg de CAP, para um Limite Máximo de Resíduo/Teor Máximo de Contaminante igual a 0,3µg/Kg (BRASIL, 2012a. BRASIL, 2012b).

## 2.6 CARACTERIZAÇÃO DO CLORANFENICOL

O cloranfenicol (CAP), D-(-)-treo-2,2-dicloro-N-[β-hidroxi-α-(hidroximetil)-p-nitrofenil], de massa molar 323,1325 g/mol, e fórmula molecular  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  (figura 4), é um antibiótico com classificação bacteriostática, de amplo espectro antibacteriano com excelentes propriedades antibacteriana e farmacocinética (OLVEIRA et al., 2007; MARTINS JUNIOR et al., 2006). Foi isolado em 1947 de *Streptomyces venezuelae* e tem sido utilizado desde 1950 para combater infecções em humanos (GIKAS et al., 2004). Pode também ser produzido por síntese química (BOTSOUGLOU & FLETOURIS, 2001).



**Figura 4.** Estrutura química do cloranfenicol (MARTINS JUNIOR et al., 2006)

O CAP possui atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas assim como contra outros grupos de microrganismos (RONNING et al., 2006). É efetivo contra cocos e bacilos (incluindo anaeróbios) gram-positivos e gram-negativos, *Rickettsia*, *Mycoplasma*, e *Chlamydia* (GIKAS et al., 2004). É um composto lipossolúvel que se difunde através da membrana celular e se liga de forma reversível à subunidade protéica 50S dos ribossomos das células de procariontes, evitando a transferência de aminoácidos das cadeias peptídicas em formação, sendo sua ação decorrente da inibição protéica (MARTINS JUNIOR et al., 2006).

É efetivo contra muitas doenças infecciosas. Isto, somado ao baixo custo e alta disponibilidade, fez do cloranfenicol uma substância muito utilizada desde 1950 no tratamento de animais em todo o mundo, incluindo pescados e demais animais destinados à produção de alimentos (RONNING et al., 2006).

O uso clínico em humanos desse antibiótico é limitado ao tratamento de doenças como febre tifóide, meningite bacteriana e conjuntivite aguda, pois está frequentemente associado ao aparecimento de sérios efeitos colaterais como anemia aplástica, uma rara e séria desordem sanguínea (FRANKLIN & SNOW, 1989; IARC, 1990; FAO/WHO, 1994; ROYBAL, 1998). O possível mecanismo de ação envolve biotransformação do CAP por bactéria intestinal a desidrocloranfenicol e subsequente nitroredução. A anemia aplástica

induzida pelo CAP é irreversível e não depende da dose. CAP pode também induzir à síndrome do bebê cinza, uma situação patológica que pode ser fatal em 40% dos casos se não for apropriadamente tratada (GIKAS et al., 2004).

Em 1996, a Comunidade Européia, através da Diretiva 96/23/EC, incluiu o CAP como substância de tolerância zero como limite residual, em tecido animal. Como controle, em dezembro de 1997, iniciou um programa de verificação de medicamentos veterinários de todos os produtos de origem animal importados de países terceiros. Sua tolerância é zero também para os Estados Unidos, Canadá, e Brasil (FERGUSON et al., 2005; OLVEIRA et al., 2007).

Em concordância com a tolerância zero para CAP, a Comissão de Decisão 2002/657/EC da Comunidade Européia estabeleceu critérios comuns para a interpretação de resultados, introduziu procedimentos para estabelecer progressivamente Limites Mínimos de Desempenho Requerido (LMDR) para métodos analíticos destinados à detecção e confirmação de substâncias proibidas ou não autorizadas em produtos dentre os quais os provenientes de piscicultura, além de leite, mel, carne, ovos e também em urina. A Comissão de Decisão 2003/181/EC, por sua vez, estabeleceu que, para métodos destinados à determinação de cloranfenicol, o LMDR seja igual ou menor a 0,30µg/kg (LC-MS) (PASCHOAL et al., 2008; MARTINS JUNIOR et al., 2006; VAN DE REIT et al., 2003; PENNEY et al., 2005; EC, 2002; EC, 2003).

## **2.7 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE CLORANFENICOL EM PESCADO**

### **2.7.1 Detecção e quantificação de resíduos de cloranfenicol**

A aplicação de métodos investigativos, seguida da aplicação de métodos confirmatórios apenas para amostras caracterizadas positivas, é comum na investigação de resíduos de cloranfenicol em tecidos animais (WHO, 2008).

As técnicas mais utilizadas para determinar quantitativamente resíduos de cloranfenicol em produtos de origem animal devem ser sensíveis, exatas, precisas, seletivas e específicas, fornecendo informações inequívocas quanto à identidade do analito, e incluem: cromatografia gasosa com detectores de captura eletrônica (CG-DCE) e espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia líquida de alta eficiência com

detecção ultravioleta (CLAE-UV), espectrometria de massas (CLAE-EM) e, mais recentemente espectrometria de massas em “*tandem*” (CLAE-EM/EM) (MARTINS JUNIOR et al., 2006; VAN DE REIT et al., 2003; PENNEY et al., 2005).

Diferentes níveis de sensibilidade das técnicas cromatográficas são dependentes, dentre outros fatores, do tipo de substância analisada e do detector empregado. De forma geral, cromatografia é uma técnica utilizada para a separação dos componentes de uma mistura, e se baseia na distribuição destes componentes entre uma fase estacionária e uma fase móvel. Tal separação resulta da diferença de interação entre componentes arrastados pela fase móvel e a fase estacionária (COLLINS, 1997; CECCHI, 2003; PEREZ et al., 2002; PITTELA, 2009).

Detectores por espectrometria de massa já possuem interfaces facilitadas para acoplamento com cromatógrafos diversos, refletindo na difusão da técnica. Fornecem informações de natureza qualitativas e quantitativas, atômicas e moleculares, relacionadas a compostos orgânicos e inorgânicos. Quando comparados a detectores mais convencionais, apresentam níveis elevados de confiabilidade e sensibilidade, baseando-se em classificações que consideram transições iônicas, relações massa/carga ( $m/z$ ), seleção, colisão e movimento de íons em campos elétricos e magnéticos (MARTINS JUNIOR et al., 2006)

A presença de grupos funcionais polares na molécula do cloranfenicol, além de requer etapas adicionais de derivação anteriores a corridas em cromatografia gasosa, tende a diminuir o limite de detecção (LD) para esta técnica, considerando detectores por captura de elétron (ECD) e por espectrometria de massas (EM) (WHO, 2008). Usualmente, as derivações mencionadas ocorrem por meio de reações de sililação para a qual, dentre reagentes aplicados, incluem-se: mistura de hexametildisilazano (HMDS), trimetilclorossilano (TMCS) e piridina (BERRY, 1987; GUDE et al., 1995); *N,O*-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) (BORIES et al., 1983); mistura de BSTFA e TMCS (VAN GINKEL et al., 1990; KEUKENS et al., 1992; GANTVERG et al., 2003); solução *N*-metil-*N*(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) (IMPENS et al., 2003).

Quando o CG é acoplado com um espectrômetro de massas, as técnicas de ionização mais freqüentemente aplicadas são as de ionização química (CI) e de impacto de elétrons (EI). A ionização química negativa (NCI) resulta em números limitados de fragmentos; entretanto, o íon molecular é sempre parte de um espectro. Devido à presença de dois átomos de cloro na molécula de cloranfenicol, reporta-se a técnica GC-

MS, no modo NCI, como uma das mais confiáveis e utilizadas em métodos confirmatórios. O limite de detecção pode ser menor do que 0,1mg/kg em tecidos de músculos. O GG-MS no modo EI é menos sensível, entretanto, produz espectros de fragmentos reprodutíveis e, portanto, passíveis de armazenamento em base de dados (WHO, 2008).

O desenvolvimento mais recente de detectores de massa cuja ionização ocorre à pressão atmosférica (API), acoplados a CLAE (CLAE/EM e CLAE-EM/EM), se tornou uma das técnicas mais confiáveis e de uso generalizado para análise de resíduos de cloranfenicol, permitindo detecção e quantificação, sem necessidade de etapas preliminares de derivação de analitos polares não voláteis (WHO, 2008). IMPENS e colaboradores (2003) desenvolveram um método analítico para investigação e confirmação de resíduos de cloranfenicol em tecidos de camarão, usando ELISA como método investigativo e CG-EM/EM e CL-EM/EM para confirmação; ambas as técnicas seletivas apresentaram valores de limites de detecção iguais a 0,1µg/kg.

O destaque da técnica de CLAE-EM/EM tem relação com sua elevada seletividade analítica quando em modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Neste modo, os analisadores de massas Q1 e Q3 selecionam os íons precursor e produto, respectivamente, definindo uma transição de massa/carga (m/z) específica. O segundo quadrupolo (Q2) funciona como uma cela de colisão, onde os íons precursores selecionados de acordo com as razões m/z em Q1 são fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID), após colisões com um gás inerte (usualmente N<sub>2</sub>) sob uma energia específica. Otimizando o detector para tal experimento (MRM), contendo mais de uma transição para o mesmo íon precursor, gera-se um método confirmatório. Assim sendo, o emprego desta técnica fornece informações referentes à retenção do composto na coluna cromatográfica, às transições monitoradas e ao sinal proporcional à concentração do analito, que permitem atingir níveis de confiabilidade e sensibilidade elevados, de acordo com os LRM estabelecidos (0,30 µg/kg) (MARTINS JUNIOR et al., 2006; VAN DE REIT et al., 2003; PENNEY et al., 2005).

## **2.7.2 Etapa de extração de CAP**

A etapa de extração do cloranfenicol de amostras biológicas compreende preparação e de purificação do extrato, e, usualmente, é assim subdividida: moagem da amostra, pesagem, diluição da amostra, homogeneização, adição de solventes orgânicos,

secagem / remoção do solvente, e diluição do concentrado. Também se fazem presentes as etapas de adição de padrão interno em concentrações conhecidas, e o emprego de micro-filtros através dos quais as amostras são passadas como forma de eliminar pequenas partículas remanescentes e que possam comprometer a determinação do analito presente no extrato e/ou os sistemas analíticos (WHO, 2008; MARTINS JUNIOR et al., 2006).

Os procedimentos descritos para extração e purificação de extratos contendo cloranfenicol são inúmeros e, somadas a variações de suas sub-etapas analíticas, incluem a aplicação da extração em fase líquida utilizando solventes orgânicos diversos (acetone nitrila, solução tampão acetone nitrila, acetato de etila, solução acetone nitrila:acetato de etila, solução clorofórmio:acetona) bem como da extração em fase sólida (colunas SiOH e poliestireno-divinilbenzeno-N-vinil pirrolidona terpolímero - Oasis HLB têm sido reportadas) (WHO, 2008; MOTTIER et al., 2003; MUNNS et al., 1994; LI et al.; 2001; RAMOS et al., 2003; GIKAS et al. 2004; NEUHAUS et al., 2002; PFENNING et al., 1998; RONNING et al., 2006; POSYNIK et al., 2003; PFENNING et al., 2002; PFENNING et al., 2003; PEREZ et al., 2002)

## **2.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

Comprovações numéricas e mensuráveis a respeito da qualidade de procedimentos quantitativos, semi-quantitativos e/ou qualitativos de análises são realizadas por meio de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, e têm sido cada vez mais reconhecidas e exigidas. Para garantir que um novo método analítico gere informações seguras, exatas e interpretáveis sobre a amostra, este deve ser submetido à minuciosa avaliação estatística, denominada validação (RIBANI et al., 2004).

A International Organization for Standardization (ISO) define validação como a confirmação, por meio de exames e evidências objetivas, de que requisitos específicos de um dado método cujo uso seja pretendido são atendidos (ABNT, 1994). Para métodos analíticos, a validação significa o processo que estabelece suas características de desempenho e limitações, identificando quais fatores podem afetar o seu desempenho e qual a extensão da influência destes fatores, demonstrando se é adequado ao propósito (EURACHEM, 1998).

Embora existam razões técnicas, legais e comerciais que justifiquem a validação de métodos analíticos, diferentes organizações definem parâmetros para validação de métodos, havendo inclusive, em certos casos, divergência de definições. O MAPA, por meio do Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários, o qual foi elaborado para ser seguido obrigatoriamente pelos laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, estabelece os parâmetros de desempenho e os requisitos de aceitação mínimos que devem ser atendidos para que um determinado procedimento analítico seja considerado validado (RIBANI et al., 2004; BRASIL, 2011).

A ANVISA, por meio da Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, publica o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, o qual apresenta as características a serem consideradas durante a validação de procedimentos analíticos. A Comunidade Européia (Diretiva 2002/657/EC) estabelece critérios e procedimentos de validação de métodos analíticos como forma de garantir a qualidade e comparabilidade de resultados analíticos. Além disso, estabelece também critérios comuns para a interpretação de resultados, e introduz procedimentos para estabelecer progressivamente limites mínimos de desempenho requeridos (LMDR) para métodos analíticos utilizados para detectar substâncias cujos limites máximos não tenham sido estabelecidos, sendo especialmente importante para substâncias como o clorenfenicol, que tem sua utilização expressamente proibida na UE (BRASIL, 2008; PASCHOAL et al., 2008; EC, 2002; EC, 2003).

A NBR ISO/IEC 17025:2005 estabelece que métodos normalizados adaptados, não normalizados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados (ABNT, 2005). O guia para a validação de métodos do EURACHEM, por sua vez, sugere que mesmo para métodos normalizados, verificações de parâmetros de desempenho devem ser realizadas. Casos nos quais o controle de qualidade indicar alterações de um método com o tempo, devem ser tratados com a realização de validação (GUIDI, 2010; SOUZA & BRITO, 2002).

Acima de divergências existentes quanto aos parâmetros de desempenho presentes em processos de validação de métodos analíticos, é essencial que os estudos nela envolvidos sejam baseados na intenção do uso do método, representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados. Assim, o laboratório deve decidir quais parâmetros de desempenho do

método necessitam ser caracterizados (LANÇAS, 2004; GUIDI, 2010; RIBANI et al., 2004; EURACHEM, 1998).

JENKE (1996) avaliou a utilização dos parâmetros de desempenho para validação de métodos nas áreas governamental, industrial e acadêmica, observando que os itens exatidão e precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) apresentavam-se com maior frequência, seguidos de especificidade, linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, robustez e sensibilidade. SOUZA & BRITO (2002) ressaltaram que a avaliação da sensibilidade torna-se fundamental em protocolos de validação para comparação de métodos. Assim, a seleção dos parâmetros de desempenho deve estar estritamente relacionada com os objetivos da validação.

LANÇAS (2004) reportou a aplicação dos seguintes parâmetros: linearidade, especificidade, limite de detecção e limite de quantificação, intervalo de aplicação, exatidão, precisão, sensibilidade, recuperação, robustez e estabilidade. O Guia de validação do MAPA estabelece os seguintes parâmetros como os necessários à determinação de desempenho e requisitos de aceitação: linearidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação (veracidade), precisão (repetitividade e reprodutibilidade) e efeito matriz. Também, recomenda robustez, além de estudo de estabilidade (analitos: amostras / soluções padrão) e incerteza de medição (padrão, combinada e expandida) (BRASIL, 2011).

A seguir são apresentadas definições de determinados parâmetros de desempenho comumente aplicados em validação de métodos analíticos.

### **2.8.1 Seletividade**

Corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias passíveis de interferirem na determinação (LANÇAS, 2004). Se um método é específico, ele deve produzir resposta para um único analito. Um método seletivo produz resposta para vários analitos que podem se distinguir entre si. Geralmente, a especificidade é considerada como 100% de seletividade (EURACHEM, 1998). Para garantir a especificidade do método, deve-se avaliar se o sinal medido pelo equipamento é devido exclusivamente ao analito ou resulta da soma das contribuições de múltiplos componentes (GUIDI, 2010).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante o processo de validação e uso subsequente do método. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004).

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de se avaliar a seletividade em métodos de separação é pela comparação da matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada desta (padrão), garantindo que nenhum interferente está co-eluído no tempo de retenção desta substância. Outro procedimento para avaliar a seletividade é por meio da coleta do composto de interesse e realização de nova análise por outra técnica cromatográfica, ou com métodos e técnicas que são específicos para a estrutura da substância de interesse (RIBANI et al., 2004).

### **2.8.2 Efeito Matriz**

Efeito Matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental. O estudo de efeito matriz é imprescindível quando se deseja trabalhar com uma curva de calibração do analito em solvente, ou seja, com uma curva de calibração não matrizada. Basicamente, procedimentos para determinação do Efeito Matriz consistem em: preparo de curva de calibração do analito em solvente puro (amostra não matrizada), curva do analito em extrato da matriz isenta de analito (amostra matrizada), e avaliação dos resultados, incluindo teste F - Fischer-Snedecor e t de Student (BRASIL, 2011).

### **2.8.3 Linearidade**

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (EURACHEM, 1998).

Pode se confirmar a linearidade e determinar a faixa de trabalho construindo curvas analíticas da concentração do analito em função da resposta obtida no sistema de

detecção, com replicatas em torno da concentração esperada do analito. Tal faixa de trabalho deve, necessariamente, contemplar a faixa de concentração esperada para a amostra de ensaio (GUIDI, 2010; BRASIL, 2011).

Os experimentos descritos para avaliação da linearidade frequentemente envolvem preparo de curvas com ou sem matriz, em sua maioria com cinco a seis níveis de concentração, incluindo ou não o ponto zero, e com um mínimo de duas a sete replicatas por nível. O método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) é consenso como ferramenta estatística para avaliação da linearidade. A maior parte das referências recomenda a estimativa dos parâmetros e dos resíduos (erros) da regressão, além da inspeção visual do gráfico x-y e do gráfico dos resíduos da regressão (SOUZA, 2007; GUIDI, 2010).

Como os estudos de validação são baseados em hipóteses estatísticas, uma verificação básica das premissas relacionadas aos testes estatísticos é fundamental para garantia de que os princípios destes testes não sejam afetados e para que os resultados obtidos sejam sustentados (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002). Assim, previamente à realização de qualquer inferência, é necessário examinar as premissas para determinar se os dados são apropriados à aplicação dos testes (SOUZA, 2007).

O método utilizado para análise de dados é o MMQO. O ajuste de uma equação de calibração pelo MMQO assume várias premissas relativas aos resíduos da regressão e ao modelo: i) os resíduos são variáveis aleatórias com média zero  $E(\epsilon_i) = 0$  e variância  $V(\epsilon_i) = \sigma^2$  constante e desconhecida; ii) os resíduos são variáveis normalmente distribuídas  $\epsilon \sim N(0, \sigma^2)$ ; iii) os resíduos são homoscedásticos, com distribuição constante ao longo dos valores de  $X_i$ ; iv) o resíduo de uma observação  $\epsilon_i$  não é correlacionado com o resíduo em outra observação  $\epsilon_j$ , ou seja,  $cov(\epsilon_i, \epsilon_j) = 0$ , sendo  $i \neq j$ . Os resíduos não são apenas não correlacionados, mas independentes; e v) a relação entre  $X_i$  e  $Y_i$  é linear (SOUZA, 2007; GUIDI, 2010).

#### **2.8.4 Faixa de aplicação**

A faixa de trabalho é o intervalo de padrões em que os requisitos de linearidade são satisfeitos, assim como os de exatidão e de precisão. O limite inferior da faixa de trabalho deve coincidir com o limite de quantificação (INMETRO, 2007; GUIDI, 2010).

### 2.8.5 Exatidão e Precisão

Exatidão é o grau de concordância entre a média de um conjunto de resultados obtidos experimentalmente e o valor verdadeiro ou reconhecido como tal. A exatidão indica a diferença entre o valor obtido e o valor real do analito na matriz, sendo geralmente expressa em termos de tendência (bias), ou seja, o desvio (positivo ou negativo) da média do valor obtido em relação ao valor real (EURACHEM, 1998).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (RIBANI et al., 2004).

Precisão é o grau de dispersão dos resultados, obtidos sob condições especificadas, em torno do valor médio. A precisão pode ser avaliada em condições de repetibilidade ou reprodutibilidade, sendo expressa em termos de coeficiente de variação, ou desvio padrão relativo (SOUZA & BRITO, 2002). Tanto a repetibilidade como a reprodutibilidade são, geralmente, dependentes da concentração do analito, e assim devem ser determinadas em um número de concentrações; se relevante, a relação entre precisão e concentração do analito deve ser estabelecida (EURACHEM, 1998).

A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados obtidos por medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, denominadas condições de repetitividade, em intervalos curtos de tempo. A repetibilidade representa a variabilidade obtida pelo mesmo analista, aplicando o mesmo método, no mesmo dia, sobre replicatas da mesma amostra (RIBANI et al., 2004).

Se a mesma amostra é analisada sob condições variadas, a medida de precisão recebe o nome de reprodutibilidade. Esta é definida como sendo o grau de concordância entre os resultados obtidos pela aplicação de um mesmo procedimento analítico, ao mesmo material, sob condições preestabelecidas (como diferentes laboratórios, operadores, equipamentos) podendo ser avaliada parcialmente pela variação de um ou mais fatores (EURACHEM, 1998). Experimentalmente, as medidas de precisão podem ser obtidas realizando-se um mínimo de 10 determinações independentes do analito em concentrações diferentes (EURACHEM, 1998) ou um mínimo de nove determinações (3 concentrações diferentes/3 replicatas cada concentração) independentes (ICH, 1996).

### **2.8.6 Sensibilidade**

É a capacidade de um método distinguir, alterando a resposta de medida do instrumento, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. A sensibilidade do método não pode ser confundida com o limite de detecção. A sensibilidade representa a capacidade de discriminação entre amostras de teores de analito próximos (EURACHEM, 1998).

### **2.8.7 Limite de detecção**

É a menor concentração de um analito na matriz que pode ser identificada com nível de confiança especificado (EURACHEM, 1998); ou seja, corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato (LANÇAS, 2004).

Experimentalmente, o limite de detecção pode ser obtido por vários procedimentos, dentre os quais: método visual, método da relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

O método visual é baseado na utilização da adição de concentrações conhecidas da substância de interesse à matriz, de modo a distinguir sinal analítico de ruído, pela visualização da menor concentração visível (detectável). Para métodos que apresentam ruído da linha de base, o limite de detecção poderá ser obtido pela relação sinal/ruído de 3:1 ou 2:1, que corresponde à concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada (RIBANI et al., 2004).

O limite de detecção pode ser encontrado a partir da leitura de 20 ou mais amostras brancas. O limite de detecção é o valor médio das leituras adicionado de três desvios padrão da média (EURACHEM, 1998; GUIDI, 2010).

### **2.8.8 Limite de quantificação**

É a menor concentração do analito na matriz que pode ser determinada em níveis nos quais requisitos de exatidão e precisão são satisfeitos (EURACHEM, 1998). Os mesmos critérios de limite de detecção podem ser adotados para o limite de quantificação, utilizando a relação 10:1. De acordo com INMETRO (2007), o limite de quantificação pode ser determinado/considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao

valor da média de sete ou mais injeções da amostra isenta de analito, somada de 5, 6 ou, mais comumente 10 desvios padrão destas mesmas injeções. BRASIL (2001) define LQ como sendo o nível mais baixo de concentração no qual foi demonstrado que os critérios de veracidade e precisão foram atendidos, desde que a relação sinal/ruído seja superior a seis ( $S/R \geq 6$ ).

O critério de aceitabilidade deve ser definido pelo analista. Comumente, para análises cromatográficas, emprega-se o método baseado nos parâmetros da curva analítica, a qual deve conter a concentração correspondente ao limite de quantificação (RIBANI et al., 2004).

A EC (2002) adota os parâmetros limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e Capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) para ensaios em setores específicos da área de alimentos (contaminantes e resíduos orgânicos em animais vivos e produtos de origem animal, no âmbito da União Européia. Para analitos proibidos, sem limites máximos estabelecidos, estes parâmetros são comparáveis aos limites de detecção e quantificação, respectivamente, uma vez que suas concentrações correspondem a medidas acima do sinal obtido para amostras brancas (matrizes isentas de analito ou para as quais analito não tenha sido detectado). No entanto, para substâncias com limites máximos estabelecidos, estes parâmetros não podem ser relacionados aos limites de detecção e quantificação, pois são expressos em relação aos limites (SOUZA, 2007).

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

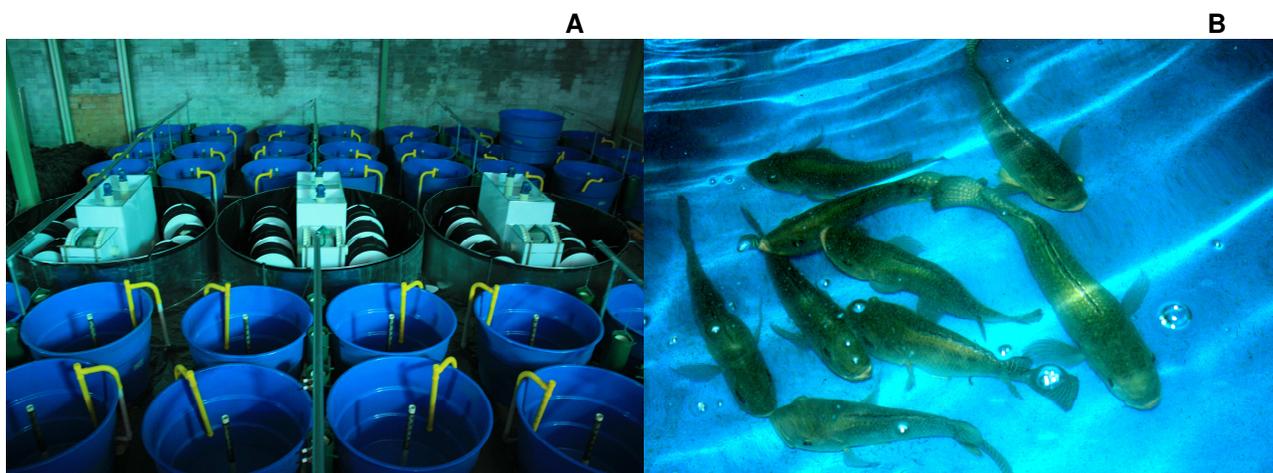
### 3.1 MATERIAIS

#### 3.1.1 Amostras

Amostras de filés peixes, na forma de massa homogênea, foram fornecidas pelo Laboratório de Aquacultura (Laqua), da Escola de Veterinária, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Tais amostras foram obtidas a partir de aproximados 6,5Kg de tilápias da espécie Nilótica (*Oreochromis niloticus*), população com idade superior a seis meses, média de peso individual igual a 800g. O nascimento e engorda desta mesma população se caracterizaram por terem ocorrido no local, à base de ração balanceada comercial, em tanques de 3000 litros, sob sistema de recirculação de água tratada em nível de conforto animal (filtragem mecânica e biológica, e temperatura média entre 25 e 27°C).

Os peixes possuíam identificação por chips eletrônicos, além de sexo natural fêmea e macho. A água de abastecimento dos tanques criatórios proveio de posto artesiano, da própria UFMG. A figura 5A apresenta os tanques de 3000 litros mencionados. Na figura 5B observam-se, em detalhe, tilápias Nilóticas com idades superiores a seis meses, no ambiente interno de um dos tanques.



**Figura 5.** Tanques do Laqua / UFMG, e tilápias Nilóticas (*Oreochromis niloticus*)

Para obtenção dos filés, foram aproveitadas as condições e o processamento de animais que não se encontravam sob condições experimentais. A retirada dos peixes dos

tanques, seguida de abate (hipotermia em gelo clorado / secção medular), além das etapas subseqüentes de descabeçamento, evisceração e filetagem precederam tal obtenção. Considerando um rendimento médio de 30% de filés, inerente a tilápias, foram disponibilizados aproximadamente 2,2Kg de filés frescos, os quais foram submetidos à moagem/trituração.

A etapa de moagem / trituração foi realizada em equipamento de porte industrial, com controle de temperatura. Efetiva massificação e homogeneidade da massa foram asseguradas. Alíquotas de aproximadamente 100 gramas da massa homogênea de filés foram então acondicionadas em sacos plásticos de polipropileno, previamente limpos e identificados.

Todas as etapas do processo foram realizadas na planta industrial do Laqua, que atende a requisitos de Inspeção Federal. A pesagem aconteceu em no laboratório. Foram utilizados equipamentos, utensílios e superfícies em aço inox, limpos e descontaminados.

As amostras foram estocadas em freezer, a -20°C, até o momento da análise.

### **3.1.2 Reagentes, solventes e consumíveis**

O grau de pureza dos reagentes e solventes utilizados para a realização dos procedimentos analíticos foi adotado de acordo com a técnica experimental empregada. Foram adquiridos: cloreto de sódio, ácido acético, formiato de amônio e ácido fórmico – fabricante Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, EUA); acetato etílico, n-heptano e isopropanol – fabricante Mallinkrodt Baker Inc., (Phillipsburg, NJ, EUA); metanol e acetonitrila – fabricante JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA); acetato de amônio – fabricante Merck (Darmstadt, Alemanha).

Padrão analítico Chloramphenicol – Fluka – VETRANAL™ (*analytical standard*) e padrão interno DL-threo-Chloramphenicol-d5 – Fluka (*analytical standard*) foram também adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. Água purificada foi obtida em um sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Amostras foram processadas em tubos para centrífuga, em polipropileno, graduado (50,0mL), estéril, com tampa rosqueável e fundo cônico (30,0 X 120mm), e filtradas em Filtros Phenomenex / Allcrom (13mm x 0,22µm), PVDF, com auxílio de seringas descartáveis, (2,0mL), em polipropileno.

### 3.1.3 Preparo de soluções

#### 3.1.3.1 Soluções padrão e fases móveis

- Solução padrão estoque de cloranfenicol

Para preparo das soluções padrão estoque de cloranfenicol, diluíram-se 250mg de padrão analítico chloramphenicol – Fluka – VETRANAL, com metanol, em balão volumétrico de 10,0mL. Assim, obteve-se a concentração 25.000ppm, correspondentes a 25mg/mL (ou 25g/L). Esta solução foi distribuída em seis vials de vidro âmbar, os quais foram armazenados em freezer a temperaturas abaixo de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- Solução de trabalho cloranfenicol

Para o preparo da solução de trabalho cloranfenicol, submeteu-se a solução padrão estoque de cloranfenicol, na concentração 25mg/mL, a diluições seriadas até a obtenção da concentração 5ppb, correspondentes a 5ng/mL (ou 0,005 $\mu\text{g/mL}$ ).

- Solução padrão estoque de D5-cloranfenicol

Para preparo das soluções padrão estoque de D5-cloranfenicol, diluíram-se 1,0mg de padrão analítico DL-threo-Chloramphenicol-d5 – Fluka, com metanol, em balão volumétrico de 10,0mL. Assim, obteve-se a concentração 100ppm, correspondentes a 0,1mg/mL (ou 0,1g/L). Esta solução foi distribuída em seis vials de vidro âmbar, os quais foram armazenados em freezer a temperaturas abaixo de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- Solução de trabalho D5-cloranfenicol

Para o preparo da solução de trabalho D5-cloranfenicol, submeteu-se a solução padrão estoque de D5-cloranfenicol, na concentração 0,1mg/mL (100ppm), a diluições seriadas, até concentração 10ppb, correspondentes a 10ng/mL (ou 0,010 $\mu\text{g/mL}$ ).

- Fases móveis (FM)

Como fases móveis, foram utilizadas: Fase móvel A – solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico, e Fase móvel B – solução metanólica contendo 0,1% de ácido fórmico. Em ambos os casos, o preparo consistiu na adição de 1,0mL de ácido fórmico para cada 1,0L de solvente.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Fortificação das amostras

As amostras de tilápias foram fortificadas com concentrações conhecidas de cloranfenicol (0,15; 0,45; 0,75; 1,05; 1,35; 1,65ng/mL), para estudo dos parâmetros de desempenho do método a ser validado. Padrão interno D5-cloranfenicol foi adicionado no nível 0,75ng/mL.

### 3.2.2 Extração

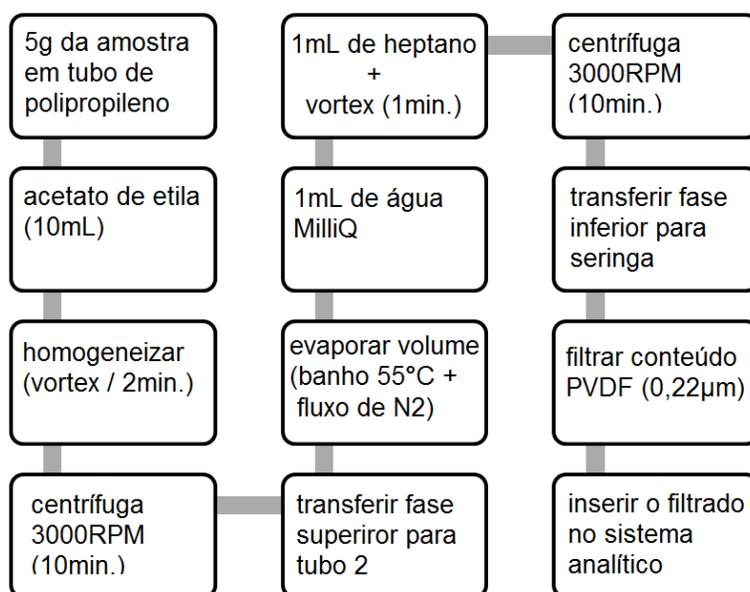
Como forma de se determinar as condições de extração do analito cloranfenicol, foram realizados testes de reprodução baseados, inicialmente, nas metodologias desenvolvidas por RUPP et al. (2003), NEUHAUS et al. (2002), STUART et al. (2003) e por STOREY et al. (2003), e em seguida na metodologia proposta por EFFKEMANN (2005), com modificações.

Os estudos de RUPP et al. (2003), NEUHAUS et al. (2002), STUART et al. (2003) e STOREY et al. (2003), semelhantes em natureza, se caracterizam como ferramentas para veiculação de métodos laboratoriais, publicados pelo FDA na forma de Boletins Informativos para Laboratórios. As metodologias apresentadas nestes estudos, e a apresentada por EFFKEMANN (2005), quando comparadas a outros trabalhos analíticos publicados também acerca do tema cloranfenicol em produtos de origem animal, apresentam simplificações como ausência da etapa de *clean-up* (extração em fase sólida – SPE) e dispensa da adição de dispersores nas etapas de trituração e secagem de amostras (MOTTIER et al., 2003; HUMMERT et al., 1995; DA SILVA et al., 2010).

O procedimento de extração a que se referem os métodos publicados pelo FDA consiste da etapa de pesagem da amostra (10,0g) em tubo de polipropileno (50,0mL) com tampa rosqueável, seguida da adição de solvente acetato de etila (15,0mL), agitação em *shaker* mecânico (10 minutos) e centrifugação (5 minutos a 3000RPM). As etapas de adição de solvente, agitação e centrifugação se repetem, sempre transferindo o sobrenadante para um segundo tubo de polipropileno de 50,0mL. O conteúdo do segundo tubo é evaporado (banho a 45 °C sob fluxo de nitrogênio), e o volume é retomado com metanol (2,0mL). A este, adicionam-se 25,0mL de solução aquosa NaCl (4%) somados a

20,0mL de solvente (hexano ou heptano). O sobrenadante é descartado após agitação (30 segundos) e centrifugação (1 minuto a 1000RPM por). Por mais uma vez, se adiciona o solvente, agita, centrifuga e descarta o sobrenadante. À fase aquosa adiciona-se acetato de etila (15,0mL), seguido de agitação (2 minutos) e centrifugação (30 segundos a 1000RPM). A fase orgânica é evaporada (banho a 45 °C sob fluxo de nitrogênio) e o volume é retomado com água MilliQ (1mL). Após filtração em membrana PVDS (0,22µm) o extrato se encontra pronto para ser analisado.

O procedimento proposto por EFFKEMANN (2005) se apresenta de forma simplificada no fluxograma da figura 6.



**Figura 6.** Fluxograma da metodologia de extração proposta por EFFKEMANN (2005)

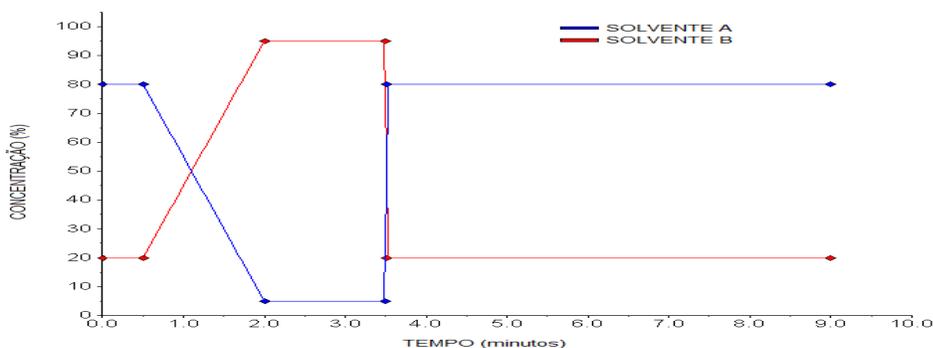
### 3.2.3 Separação, detecção e equipamentos

As análises foram realizadas em sistema CLAE-EM/EM, empregando cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent 1200 Series HPLC (*Agilent Technologies Inc.*, Santa Clara, CA, EUA), equipado com bomba quaternária e amostrador automático, acoplado a espectrômetro de massas triploquadrupolar QTRAP 5500<sup>TM</sup>, Applied Biosystems/MDS Sciex (Sciex, Toronto, CA), com fonte de ionização Turbo V<sup>TM</sup> operado no modo de ionização *TurbolonSpray*<sup>®</sup> (“*electrospray*” – ESI) e equipado com bomba de infusão Harvard Apparatus (Hollistn, MA, EUA). A aquisição dos dados foi realizada com o *software Analyst*<sup>®</sup> versão 1.4.1.

### 3.2.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A eluição cromatográfica foi realizada em coluna C18 Aqua-125A, 5 microns (50mm x 2.00mm) Phenomenex Co. (Torrance, CA. EUA), sob temperatura de 40 °C ( $\pm 1$  °C) (RUPP et al., 2003; NEUHAUS et al., 2002; STUART et al., 2003; EFFKEMANN, 2005).

O gradiente de eluição foi otimizado, a partir de testes consecutivos, com vistas à resolução do pico cromatográfico obtido, tendo sido empregado da seguinte forma: inicialmente com 80% da fase A (solução aquosa, contendo 0,1% de ácido fórmico) e 20% da B (solução metanólica, contendo 0,1% de ácido fórmico), permanecendo nestas condições por 0,5 minutos, com posterior rampa linear da fase B para 95% e da fase A para 5%, em 1 minuto. Esta composição é mantida por mais 1,5 minutos, quando há alteração da fase A e da fase B para as condições iniciais de 80% e 20%, respectivamente, em 0,1 minutos. Esta condição de equilíbrio é mantida por mais 5,49 minutos, totalizando o tempo de análise em 9 minutos (as condições de gradiente, aplicadas no método, podem ser observadas na figura 7). O fluxo da fase móvel foi mantido em 700 $\mu$ L por minuto, e o volume de injeção foi de 10 $\mu$ L (*needle wash location: flush port; wash time: 40 segundos*).



**Figura 7.** Gradiente de eluição cromatográfica do método

### 3.2.3.2 Espectrometria de massas

O espectrômetro de massas foi operado em modo MRM com ionização por “*electrospray*”, no modo de íons negativos, a 600°C. A voltagem do capilar foi otimizada à -4500 V, com um potencial de orifício (“*Declustering Potential*” – DP) de -100 V. Nitrogênio foi utilizado como gás de colisão (“*CAD Gas*”) e gás de dessolvatação (evaporação do solvente) (“*Curtais Gas<sup>TM</sup>*”) às pressões média e 15 psi, respectivamente. Ar sintético

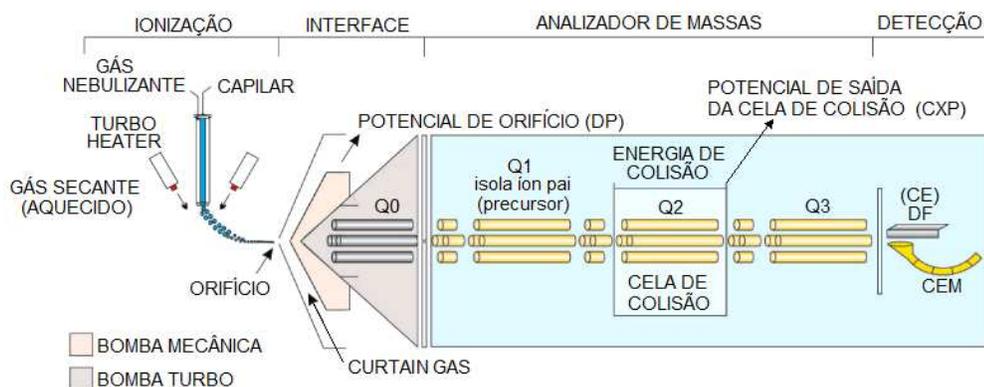
ultrapuro (Ar “Zero”) foi utilizado como gás nebulizante (“GS1”) e como gás secante aquecido (“GS2”) às pressões respectivas de 50 e 50 psi.

Como critério IDA (*Information Dependent Acquisition*), estabeleceu-se a seleção “1 de 1” para o pico cromatográfico que excedesse a intensidade de 500 contagens por segundo (cps). Desta forma, os espectros de massas ( $MS^2$ ) foram adquiridos, em modo de Scan - *Enhanced Product Ion* (EPI), com trapeamento em Q0 (*Fixed LIT time*: 100 msec. de *fill time* (tempo de acúmulo); Q3 *Entry Barrier*: 8V; *Scan Rate*: 1000 Da/seg, no intervalo de  $m/z$  50 - 330.

Os fragmentos selecionados para o íon precursor  $[M - H]^-$  de  $m/z$  320.9 (CAP) foram 152.1 e 256.9. Para o íon precursor de  $m/z$  326.0 (D5-CAP / Padrão interno), foi selecionado o fragmento 157.0 (MARTINS JUNIOR et al., 2006; RUPP et al., 2003; NEUHAUS et al., 2002; GUY et al., 2004). A tabela 6 apresenta os parâmetros de DP (potencial de orifício), CE (energia de colisão), CXP (potencial de saída da cela de colisão) e *Dwell time*, otimizados para cada transição de  $m/z$  monitorada. A figura 8 possibilita a visualização esquemática do sistema ESI/EM/EM (MARTINS JUNIOR et al., 2006; EFFKEMANN, 2005).

**Tabela 6:** Parâmetros: potencial de orifício (DP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da cela de colisão (CXP) utilizados no método, para transições em modo MRM

Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (ev)	CUR (psi)	CXP (V)	Dwell time (mseg.)
320.9	152.1	-100	-10	24 (spread: 4)	15	5	290
320.9	256.9	-100	-10	16 (spread: 4)	15	17	290
326.0	157.0	-100	-10	24 (spread: 4)	15	5	290



**Figura 8.** Esquema do sistema ESI/EM/EM (MARTINS JUNIOR et al., 2006).

### 3.2.4 Validação do método para determinação de cloranfenicol

A adequação do método de análise de cloranfenicol em pescado foi determinada com base nos resultados dos parâmetros linearidade, seletividade, efeitos de matriz, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação experimentais (SOUZA, 2007; GUIDI, 2010; BRASIL, 2011). Critérios de aceitabilidade foram determinados, conforme sugerido por SOUZA (2007). O nível de significância adotado nos testes de hipótese foi  $\alpha = 0,10$  para os testes de normalidade e independência e de 0,05 para os demais testes, tendo sido os cálculos realizados em planilhas comerciais, cujos resultados foram previamente validados frente àqueles obtidos em diferentes softwares de análises estatísticas.

#### 3.2.4.1 Linearidade

Com relação à linearidade, foram realizados ensaios com soluções padrão, com e sem interferência da matriz, avaliando área e altura de picos cromatográficos obtidos experimentalmente (SOUZA et al., 2001). Para a construção da curva padrão foi utilizada uma solução aquosa (solvente: água Milli-Q) contendo padrão analítico cloranfenicol, com os seguintes níveis de concentração: 0,15; 0,45; 0,75; 1,05; 1,35 e 1,65 (ng/mL) – correspondentes aos níveis 0,03; 0,09; 0,15; 0,21; 0,27 e 0,33 ( $\mu\text{g/Kg}$ ), em amostra, respectivamente. Cada nível foi preparado em triplicata, com a adição de PI, na concentração 0,75ng/mL (correspondente 0,15 $\mu\text{g/Kg}$ , em amostra). Cada replicata independente foi inserida no sistema de detecção analítica, de forma aleatória (RONNING et al., 2006).

Os parâmetros da regressão (interseção e inclinação) foram calculados pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) e os resíduos foram calculados por meio da diferença entre a concentração real e a concentração obtida pela regressão linear. Valores de resíduos dispersos foram diagnosticados e excluídos dos dados originais pelo teste de resíduos padronizados de Jackknife. Esse método foi aplicado sucessivamente até que novos valores dispersos não fossem mais detectados, sendo a exclusão máxima igual a 22,2% do número de dados originais (HORWITZ, 1995). As premissas relativas à análise da regressão foram verificadas: normalidade (RYAN & JOINER, 1976), homocedasticidade (LEVENE, 1960; BROWN & FORSYTHE, 1974) e independência dos resíduos da regressão (DURBIN & WATSON, 1951). A análise de

variância foi adotada para verificar a adequação do ajuste do modelo linear por meio da significância da regressão e do desvio da linearidade avaliado contra o erro puro.

#### 3.2.4.2 Seletividade e efeito matriz

Perfis cromatográficos da matriz adicionada das soluções padrão de cloranfenicol foram comparados com o perfil cromatográfico do cloranfenicol em solvente para análise da seletividade. Por meio de cromatograma TIC (*“Total Ion Chromatogram”*) obtido para os fragmentos monitorados, foi garantida resolução e adequada separação de picos cromatográficos (BRASIL, 2011). Cromatogramas extraídos para os fragmentos de  $m/z$  320.9>152.1 e 320.9>256.9 (*“Extracted Ion Chromatogram”* – XIC), em conjunto com espectro de massas em EPI (*“Enhanced Product Ion”*) que confirma a presença destes mesmos fragmentos, também foram verificados, confirmando a atribuição do pico cromatográfico obtido ao componente de interesse.

Duas curvas de calibração foram construídas, com níveis de concentração na faixa de 0,15 a 1,65ng/mL (0,03 a 0,33 $\mu$ g/Kg, em amostra), tendo sido: uma curva em solvente (água Milli-Q) e outra curva em matriz (extrato aquoso resultante do procedimento de extração, conforme descrito na parte experimental). Ambas as curvas foram construídas baseadas em triplicatas independentes para cada nível, as quais foram analisadas em ordem aleatória e em etapa única (batelada) de experimentos.

Os parâmetros da regressão foram então calculados e as premissas, relativas ao MMQO, avaliadas para as curvas. Uma vez confirmado o ajuste ao modelo linear, foi verificada a homogeneidade ou heterocedasticidade entre as variâncias dos resíduos das curvas, pelo teste de F (SOUZA, 2007). A inclinação e a interseção obtidas para a curva do solvente foram comparadas, pelo “teste de t”, com a inclinação e interseção estimadas para a curva na matriz, utilizando variâncias combinadas em caso de homogeneidade e variâncias distintas em caso de heterocedasticidade entre as variâncias dos resíduos das curvas (BRASIL, 2011; SOUZA, 2007)

#### 3.2.4.3 Precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação

Os parâmetros exatidão e precisão (sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade parcial), bem como os limites de detecção e de quantificação, foram

pesquisados em ensaios com amostra isenta de cloranfenicol. Tal amostra teve seu perfil determinado após dez injeções, tendo sido então adicionada de padrão nos níveis correspondentes a 0,03; 0,09; 0,15; 0,21; 0,27 e 0,33 ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ). Três lotes destas amostras foram separados, tendo sido analisados em três dias distintos, por dois analistas diferentes. Considerando os resultados dos testes de efeito matriz, curvas matrizadas foram preparadas para calcular as concentrações de cloranfenicol nas amostras (GUIDI, 2010).

Valores dispersos foram investigados nos resultados de recuperação aparente obtidos para cada nível de concentração, pelo teste de Grubbs (GRUBBS, 1969; BARET & LEWIS, 1994; BURKE, 2001). O teste de Grubbs foi aplicado sucessivamente até que novos valores dispersos não fossem detectados, ou até a exclusão máxima de 22,2% no número original de resultados independentes (HORWITZ, 1995).

Exatidão foi investigada por meio da recuperação aparente obtida para as nove replicatas de amostras adicionadas em cada nível de concentração. Os critérios adotados para considerar os resultados satisfatórios foram recuperações no intervalo entre 50 e 120%, conforme previsto para analitos com concentrações abaixo de  $1\mu\text{g}/\text{Kg}$  (EC, 2002; AOAC, 2002; BRASIL 2011).

A precisão, sob condição de repetibilidade e de reprodutibilidade parcial, foi expressa em termos de desvio padrão relativo de repetibilidade e desvio padrão relativo de reprodutibilidade (DPRr e DPRR, respectivamente), obtida para as replicatas de amostras adicionadas nos níveis de concentração estudados. Segundo a ANVISA, valores máximos aceitáveis para desvios padrão relativos devem ser definidos de acordo com o método, concentração do analito, tipo de matriz e finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003). Contudo, considerando-se que a precisão varia com a concentração do analito, os valores de desvios padrão relativos de reprodutibilidade parcial (DPRR) foram comparados com aqueles estimados pelas equações de Horwitz. O DPRr foi considerado aceitável quando dentro de dois terços (EC, 2002) do DPRR calculado pela equação de HORWITZ (1982) modificado por THOMPSON (2000). Os desvios máximos aceitáveis para cada nível de concentração, estimados pela equação de THOMPSON (2000), estão descritos na Tab. 7.

**Tabela 7.** Critérios de aceitabilidade do desvio padrão relativo (DPR) para cada nível de concentração

<b>Concentração (ng/mL)</b>	<b>DPRr (%)</b>	<b>DPRR (%)</b>
0,15	2	3
0,45	7	10
0,75	11	17
1,05	15	23
1,35	20	30
1,65	24	36

Fonte: THOMPSON (2000).

DPRr:desvio padrão relativo sob condições de repetibilidade.

DPRR:desvio padrão relativo sob condições de reprodutibilidade.

O limite de detecção foi determinado calculando-se a média dos ruídos provenientes de injeções de amostras brancas, adicionada de três vezes o desvio padrão destas mesmas injeções (EURACHEM, 1998). O limite de quantificação teórico foi determinado a partir da média de ruídos provenientes destas mesmas injeções de amostras brancas, adicionada de dez vezes o desvio padrão destas injeções (INMETRO, 2007; SOUZA, 2007).

O limite de quantificação do método (experimental) foi determinado a partir da menor concentração na qual requisitos de exatidão e precisão foram atendidos (EURACHEM, 1998; SOUZA, 2007; BRASIL, 2011).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO

#### 4.1.1 Extração

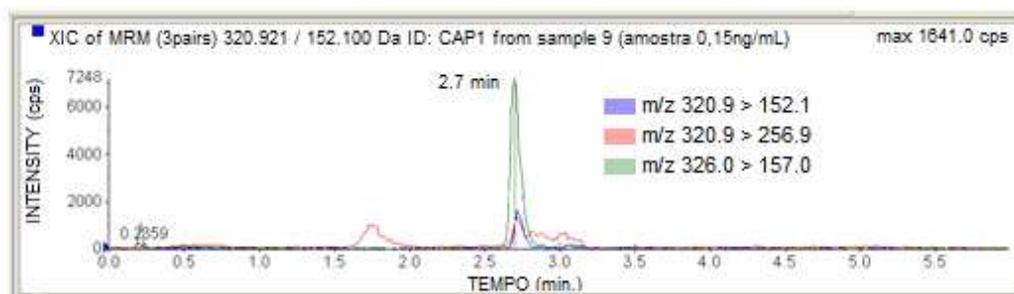
Os testes baseados na reprodução da metodologia proposta pelos estudos de STUART et al. (2003), RUPP et al. (2003), STOREY et al. (2003) e NEUHAUS et al. (2002), se mostraram requerentes de tempo excessivo na realização do processo de obtenção do extrato final. Limitando-se a uma quantidade de 10 amostras por batelada, tal processo se consistiu de aproximadas 9 horas antecedentes à inserção da amostra no sistema analítico, o que, considerando necessidades atreladas aos experimentos de validação da metodologia analítica, se mostrou limitante quanto à produtividade e tempo. Somado a isto, o uso de elevados volumes de solventes motivou a busca por metodologia alternativa, que se mostrasse mais eficiente, limpa e que possibilitasse redução dos custos de extração do analito cloranfenicol (BRASIL, 2011; RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2004; SOUZA, 2007).

Os testes subsequentes tiveram como base a metodologia proposta por EFFKEMANN. (2005). Como modificação, propôs-se o uso de heptano, frente à hexano, na etapa de remoção da porção mais apolar do extrato, minimizando a exposição a solvente com características neurotóxicas (STUART et al., 2003; RUPP et al., 2003). Também, ao método foi adicionada etapa de filtração em membrana PVDS (0,22µm), preventiva ao sistema analítico, e proposta por RUPP et al. (2003), NEUHAUS et al. (2002), STUART et al. (2003) e STOREY et al. (2003). O tempo total da extração variou entre 5 e 6 horas, com aplicação para até 21 amostras por batelada, adequando-se às necessidades experimentais do estudo.

#### 4.1.2 Separação por HPLC

A escolha do uso de gradiente de eluição do composto, em coluna de fase reversa, se justificou por apresentar melhor resolução cromatográfica, quando comparado à eluição isocrática (SIQUEIRA, 2007). Considerando o baixo *background*, inerente à aquisição de dados em MRM, e considerando as ferramentas IDA (Information-Dependent Acquisition)

– EPI (Enhanced Product Ion) aplicadas em software, cromatogramas seletivos e específicos foram obtidos para íons produto monitorados. Neste sentido, o Dwell Time (tempo de ciclo) foi calculado conforme proposto por AB (2008), resultando em 290 milissegundos. O volume de injeção determinado foi igual a 10µL. A figura 9 mostra um cromatograma da amostra padrão, em concentração de 0,15ng/mL, correspondente à 0,03µg/Kg em amostra, nas condições de separação e detecção estabelecidas. Nesta figura, observa-se a detecção de todas as transições, no tempo de retenção para o composto igual a 2,7 minutos.



**Figura 9.** Cromatograma da amostra padrão, nas condições de separação e detecção estabelecidas

## 4.2 OTIMIZAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

O espectrômetro de massas foi otimizado eletronicamente, tendo sido tal otimização realizada em dois estágios eletrônicos. O primeiro estágio se referiu à infusão direta de solução contendo cloranfenicol na concentração correspondente a 10ppb, possibilitando a obtenção de melhorias em valores de voltagens: DP, EP, CE, CXP. O segundo estágio se referiu à inserção, por meio do sistema de injeção cromatográfica (*Flow Injection Analysis* – FIA), sob fluxo igual a 10µL/min., de uma solução contendo cloranfenicol na concentração correspondente a 1ppb, possibilitando a obtenção de melhorias em valores de temperatura (fonte) e pressões: CUR, CAD, GS1, GS2.

A infusão do composto no sistema ESI/EM/EM permitiu sua caracterização nos modos EM (*Q1 Scan*) e EM/EM (*Product Ion Scan* e *Precursor Ion Scan*), em ionização por *electrospray*, cujas informações são referentes à ionização do composto (identificação do íon precursor) e ao padrão de fragmentação estrutural, respectivamente. Assim, os íons produto de interesse foram confirmados através do modo *Precursor Ion*

Scan". No modo EM ("Q1 Scan"), um pico de  $m/z$  320.9, correspondente à molécula desprotonada do CAP, apresentou alta detectabilidade no modo de íons negativos.

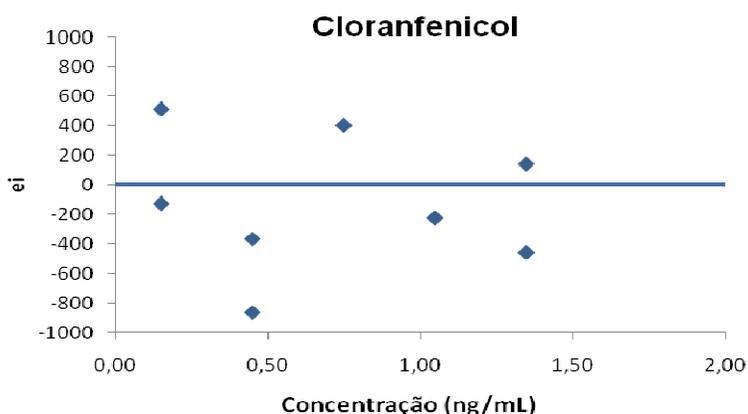
O espectro de massas obtido em modo EM/EM ("Product Ion Scan") apresentou fragmentos característicos do CAP, dentre os quais foram escolhidos dois íons produto de  $m/z$  152.1 e 256.9. A análise quantitativa do CAP, tendo sido realizada no modo MRM, através do monitoramento das transições de  $m/z$  152.1 e 256.9, para o íon precursor  $[M - H]^-$  de  $m/z$  320.9, proporcionou a confirmação dos resultados. A transição mais sensível observada foi a de  $m/z$  320.9>152.1, tendo sido proposta para quantificação.

O monitoramento das transições descritas conferiu ao método analítico um número de pontos de identificação adequado ao recomendado pela Comunidade Europeia ("Commission Decision 2002/657/EC") para substâncias com tolerância zero, que é de quatro pontos, correspondentes à seleção de um íon precursor e dois íons produto (duas transições de  $m/z$ ), além do tempo de retenção em coluna (EC, 2002).

## 4.3 VALIDAÇÃO: MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE CLORANFENICOL

### 4.3.1 Linearidade

O gráfico exploratório dos resíduos da regressão, após tratamento dos valores dispersos pelo teste de resíduos padronizados de Jackknife, pode ser observado na Fig.10.



**Figura 10.** Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva de cloranfenicol analisada em solvente (ei = resíduo da regressão).

Não foram observados mais do que três valores dispersos, correspondentes ao limite máximo de pontos passíveis de remoção, ou seja, 22,2% dos 18 dados inseridos. Os resíduos da regressão foram calculados por meio da diferença entre a concentração real e a concentração obtida pela equação da reta. A análise visual do gráfico de resíduos demonstrou que não houve tendência óbvia na distribuição dos resíduos.

As premissas de que os resíduos da regressão seguiram distribuição normal, além de serem homocedásticos e independentes, foram confirmadas, garantindo a aplicação dos testes de hipóteses F, para estimativa da significância da regressão e do desvio de linearidade (Tabela 8).

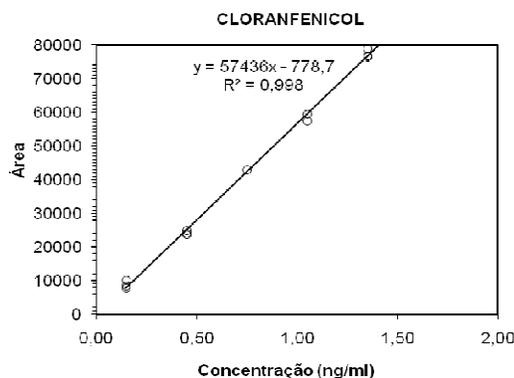
**Tabela 8.** Avaliação das premissas do modelo e da linearidade para a curva de cloranfenicol, em solvente

ESTATÍSTICA (CLORANFENICOL)										
Numero de observações	Normalidade		Homocedasticidade		Independência		Regressão		Desvio da Linearidade	
n	R	P	tL	p	d	p	F	p	F	p
18	0,9739	P>0,10	0,471	0,6458	2,421	0,10	6548,55	8,45	1,140	0,404
(e-18)										

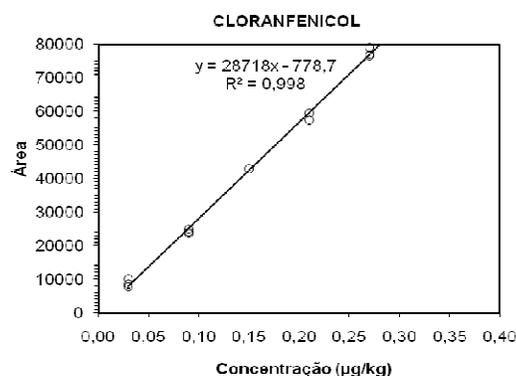
*n* = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, *p* = significância, *tL* = estatística t de Levene, *d* = estatística de Durbin-Watson, *F* = razão de variâncias.

Os coeficientes de correlação de Ryan-Joiner indicaram que os desvios da normalidade não foram significativos ( $p > 0,10$ ). A variância dos erros ao longo dos níveis de concentração estimada pelo teste de Levene modificado também não foi significativa ( $p > 0,05$ ), sugerindo homocedasticidade. A estatística de Durbin-Watson demonstrou independência dos resíduos ( $p > 0,10$ ).

Os dados obtidos foram avaliados como sendo bem ajustados ao modelo linear. Regressão significativa ( $p < 0,001$ ) e desvios da linearidade não significativos ( $p > 0,05$ ) indicaram que a faixa de 0,15 A 1,65ng/mL foi linear para cloranfenicol. A curva de solvente (concentração em ng/mL x área do pico), com sua equação da reta e coeficiente de determinação, pode ser observada na figura 11. A correspondente desta mesma curva, para concentrações expressas em µg/Kg, pode ser observada na figura 12.



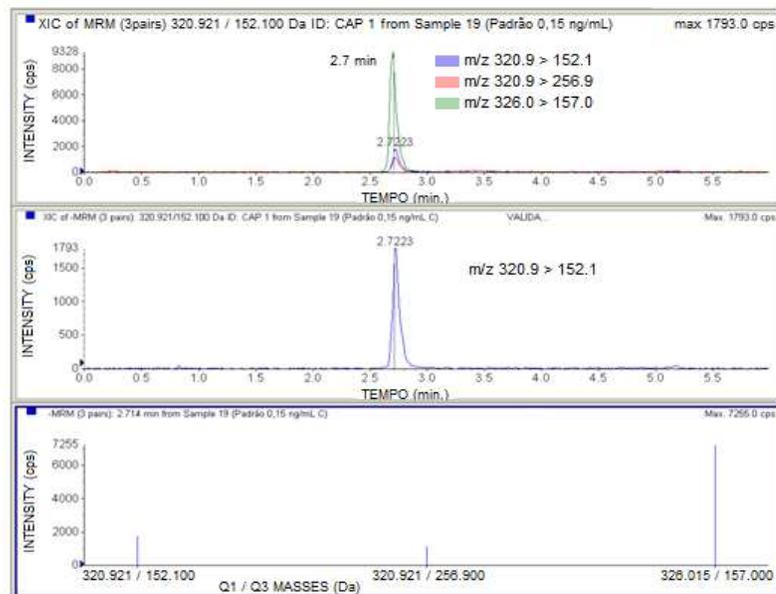
**Figura 11.** Curva de calibração de cloranfenicol em solvente (0,15 a 1,65ng/mL), com sua equação da reta e seu coeficiente de determinação (y = resposta em área dos picos, x = concentração da amina em ng/mL,  $R^2$  = coeficiente de determinação).



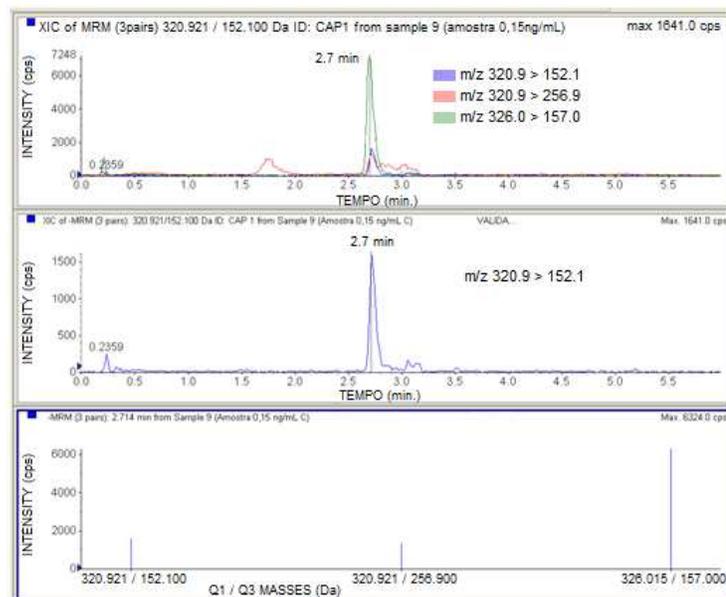
**Figura 12.** Curva de calibração de cloranfenicol na faixa correspondente a 0,03 – 0,33µg/Kg) com sua equação da reta e seu coeficiente de determinação (y = resposta em área dos picos, x = concentração da amina em ng/mL,  $R^2$  = coeficiente de determinação).

#### 4.3.2 Seletividade e efeito de matriz

Perfis cromatográficos e espectrométricos da matriz adicionada da solução padrão de cloranfenicol foram comparados aos do solvente adicionado da solução padrão de cloranfenicol. Tais comparações, somadas às informações de caracterização da etapa de otimização do espectrômetro de massas, indicaram a seletividade do método. As figuras 13 e 14 apresentam o cromatograma (“*Total Ion Chromatogram*” – TIC) de cloranfenicol em solvente e em matriz, respectivamente (concentração: 0,15ng/mL), além de seus cromatogramas extraídos para o fragmento de  $m/z$  320.9>152.1 (“*Extracted Ion Chromatogram*” – XIC), e dos espectros de MS<sup>2</sup> (espectro “*Enhanced Product Ion*” – EPI) para o mesmo fragmento 320.9>152.1, e para os demais 320.9>152.1 e 320.9>256.9 (PI).



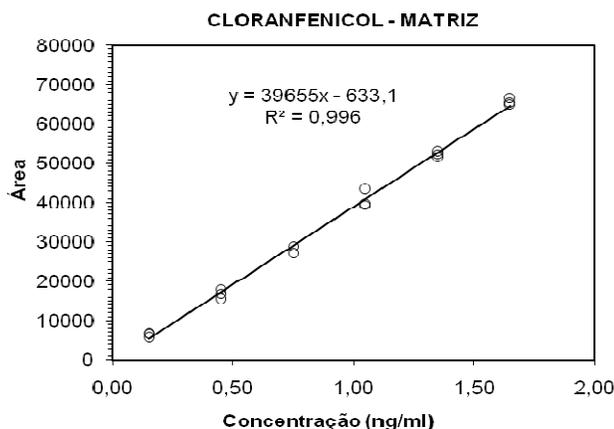
**Figura 13:** Cromatograma de cloranfenicol em solvente: TIC; XIC e espectro MS<sup>2</sup> (fragmentos: 320.9>152.1; 320.9>152.1; 320.9>256.9 (PI)).



**Figura 14:** Cromatograma de cloranfenicol em matriz: TIC; XIC e espectro MS<sup>2</sup> (fragmentos: 320.9>152.1; 320.9>152.1; 320.9>256.9 (PI) – concentração: 0,15ng/mL).

Curva em matriz foi construída como descrito na parte experimental. Os valores extremos foram tratados e todas as premissas relativas ao MMQO (normalidade, homocedasticidade e independência) foram confirmadas. A significância da regressão e os desvios de linearidade não significativos confirmaram o modelo linear e indicaram a possibilidade de comparação das inclinações e interseções das curvas matrizada e em

solvente, pelo teste de t, para avaliação do efeito da matriz (Tabela 9). A curva de calibração de cloranfenicol construída na matriz tilápia se encontra apresentada na Fig.15.



**Figura 15.** Curva de calibração de cloranfenicol na matriz tilápia (0,15 a 1,65ng/mL), com sua equação da reta e seu coeficiente de determinação ( $y$  = resposta em área dos picos,  $x$  = concentração da amina em ng/mL,  $R^2$  = coeficiente de determinação).

**Tabela 9.** Avaliação das premissas do modelo e da linearidade para a curva de cloranfenicol, em matriz tilápia

ESTATÍSTICA (CLORANFENICOL)										
Numero de observações	Normalidade		Homocedasticidade		Independência		Regressão		Desvio da Linearidade	
N	R	P	tL	p	d	p	F	p	F	p
18	0,9931	P>0,10	0,562	0,5826	1,835	0,10	4059,96	1,13	1,553	0,254
(e-19)										

$n$  = número de observações,  $R$  = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner,  $p$  = significância,  $tL$  = estatística t de Levene,  $d$  = estatística de Durbin-Watson,  $F$  = razão de variâncias.

As curvas no solvente (dados apresentados na linearidade) e na matriz foram analisadas simultaneamente para evitar que efeitos temporais fossem interpretados como diferenças devido à matriz. O teste de F indicou homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas no solvente e matriz para o cloranfenicol, possibilitando o uso do teste de t com variâncias combinadas para avaliação do efeito da matriz.

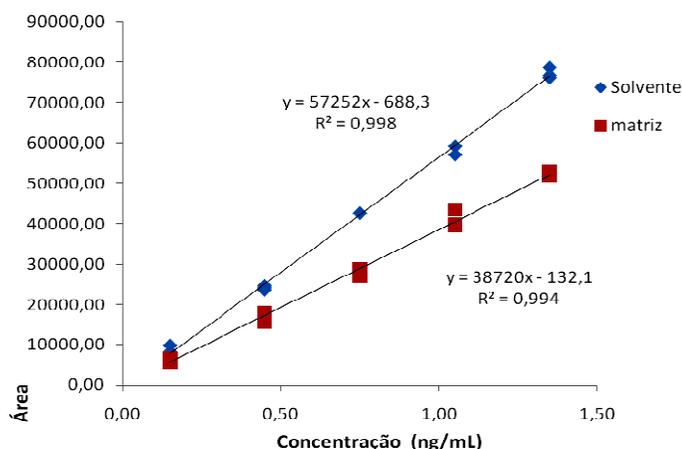
Na Tabela 10 estão expostos os resultados das comparações das inclinações e interseções das curvas de calibração construídas no solvente e na matriz. A interseção não foi significativamente diferente, a 5% de probabilidade, entre as duas curvas. Houve, no entanto, diferença significativa entre as inclinações das duas curvas para cloranfenicol ( $\alpha = 0,05$ ). Com base neste resultado, foi possível inferir ter havido efeito matriz, ou seja, a

curva de cloranfenicol no solvente não forneceu as mesmas respostas da curva de cloranfenicol na matriz tilápia, para as mesmas faixas de concentração estudadas (Figura 16). Assim sendo, para construção da curva padrão, deve-se fazer uso da curva na matriz frente ao uso da curva no solvente.

**Tabela 10.** Comparação entre as interseções e inclinações das curvas de calibração na matriz tilápia, e em solvente, para cloranfenicol (2,0 a 10,0mg/L).

ESTATÍSTICA (CLORANFENICOL)				
Numero de observações	Comparações entre interseções		Comparações entre inclinações	
<b>n</b>	<b>ta</b>	<b>p</b>	<b>tb</b>	<b>p</b>
18	0,151	<<0,05	18,938	0,881

*ta* = estatística t para contrastes entre interseções, *tb* = estatística t para contrastes entre inclinações, *p* = significância. Valores em negrito e sublinhados são significativos a 5% de probabilidade.



**Figura 16.** Sobreposição das curvas de calibração de cloranfenicol, em solvente e em matriz (0,15 a 1,65ng/mL) - diferença significativa entre inclinações ( $\alpha = 0,05$ )

#### 4.3.3 Precisão e exatidão

Para os níveis de concentração estudados, o teste de Grubbs não indicou mais do que dois valores dispersos (22,2% dos nove dados originais), a 5% de significância, entre os resultados de recuperação aparente obtidos para amostras adicionadas de cloranfenicol. Os resíduos obtidos pela diferença entre a recuperação aparente média e os valores individuais de recuperação aparente em cada dia, para cada nível de concentração, apresentaram distribuição normal ( $p > 0,10$ ) e homocedasticidade ( $p > 0,05$ ), permitindo a estimativa do desvio padrão relativo de repetitividade (DPRr) e do desvio padrão relativo de reprodutibilidade (DPRR) por análise de variância.

As médias de recuperação aparente alcançadas para amostras de tilápia nos níveis 0,03; 0,09; 0,15; 0,21; 0,27 e 0,33 $\mu$ g/Kg variaram entre 91,33 e 108,00%, estando na faixa aceitável de (50,0 a 120,0%) (EC, 2002). Os valores de DPRr variaram entre 1,04 e 4,85% e os valores de DPRR obtidos variaram entre 1,42 e 5,51% (Tab. 11). Valores de DPRR e de DPRr idênticos foram estimados quando a variância de repetibilidade foi maior que a de reprodutibilidade, sendo atribuído o valor zero para variação entre ensaios (SOUZA, 2007).

Estes resultados sinalizaram a faixa de aplicabilidade do método validado na faixa de 0,03 a 0,33 $\mu$ g/Kg para cloranfenicol.

**Tabela 11.** Médias de recuperação aparente e desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de tilápia adicionadas de cloranfenicol em níveis determinados de concentração.

ESTATÍSTICA (CLORANFENICOL)			
Concentração (ng/mL)	$\bar{R}$ (%)	DPRr (%)	DPRR (%)
0,15	99,2	3,5	5,5
0,45	100,1	4,9	4,9
0,75	100,2	1,0	1,4
1,05	100,9	3,0	3,6
1,35	100,2	2,3	2,7
1,65	98,8	2,8	2,8

$\bar{R}$  (%)= média de recuperação aparente, DPRr = desvio padrão relativo de repetibilidade, DPRR = desvio padrão relativo de reprodutibilidade parcial.

Critérios de aceitação de para  $\bar{R}$ : 50% a 120%

Critérios de aceitação (%) para DPRr:

0,15ng/mL: 2 ; 0,45ng/mL: 7; 0,75ng/mL:11; 1,05ng/mL: 15; 1,35ng/mL: 20; 1,65ng/mL: 24

Critérios de aceitação para DPRR:

0,15ng/mL: 3; 0,45ng/mL: 10; 0,75ng/mL: 17; 1,05ng/mL: 23; 1,35ng/mL:30; 1,65ng/mL: 36.

#### 4.3.4 Limites de quantificação e detecção

Os valores referentes aos limites de detecção e de quantificação, calculados para cloranfenicol, se encontram na Tabela 12. Para o limite de detecção, o valor se refere à média dos ruídos provenientes das dezessete injeções de amostras isentas de cloranfenicol, adicionada de três vezes o desvio padrão destas mesmas injeções.

Para o limite de quantificação teórico, o valor se refere à média dos ruídos provenientes das dezessete injeções de amostras isentas de cloranfenicol, adicionada de dez vezes o desvio padrão destas mesmas injeções. O limite de quantificação do método (experimental) foi determinado como sendo igual a 0,03 $\mu$ g/Kg. Este valor se refere ao

menor nível de concentração estudado no qual os requisitos exatidão e precisão do método foram atendidos.

**Tabela 12.** Limites de detecção e de quantificação para cloranfenicol, na matriz tilápia

<b>LIMITES - CLORANFENICOL</b>		
<b>Limite de detecção</b>	<b>Limite de quantificação (teórico)</b>	<b>Limite de quantificação (experimental)</b>
0,0036µg/Kg	0,017µg/Kg	0,03µg/Kg

#### **4.4 AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS ALEATÓRIAS DE PESCADO**

Como forma de se obter amostras de tilápias da espécie Nilótica (*Oreochromis niloticus*) em quantidades suficientes para a execução dos experimentos envolvidos no trabalho em questão, dentre os quais os procedimentos de validação, amostras aleatórias, representantes de grupos identificados por chips eletrônicos, foram fornecidas pelo Laboratório de Aquacultura (Laqua), da Escola de Veterinária, da Universidade Federal de Belo Horizonte. Tais amostras se encontravam em tanques de 3000 litros, sob sistema de recirculação de água tratada em nível de conforto animal (filtragem mecânica e biológica, e temperatura média entre 25 e 27 graus Celsius).

O propósito principal destas análises aleatórias quanto à presença de cloranfenicol, realizadas em períodos de tempo espaçado, foi a busca pela classificação potencial de cada um dos grupos quanto a fornecimento futuro de amostras isentas de analito – uma vez que resposta positiva quanto à possibilidade de fornecimento de quantidades suficiente de amostras ainda estava sendo avaliada para tais grupos, por responsáveis no Laqua. Outra variável que motivou a busca por amostras aleatórias foi a necessidade de se encontrarem disponíveis quantidades relativamente pequenas de amostras, no entanto suficientes para a execução de testes relacionados aos procedimentos de extração (descritos na parte experimental deste trabalho).

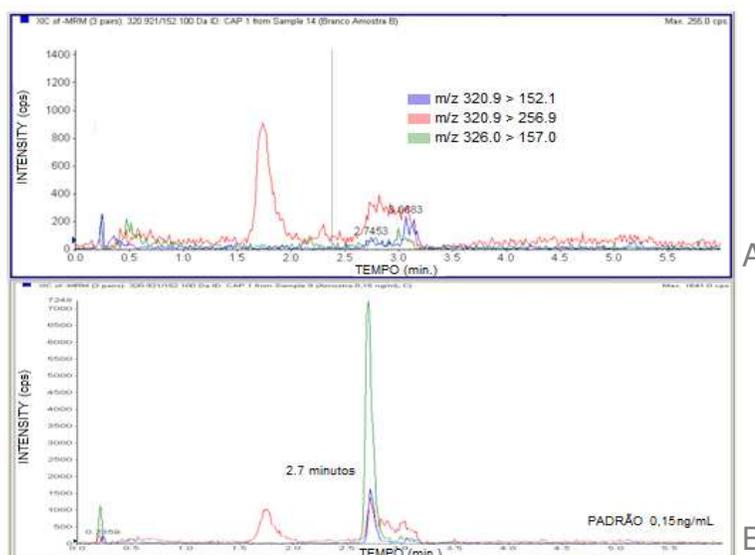
Assim sendo, em função de as submissões das amostras a procedimentos analíticos terem sido realizadas após otimização do método para baixos limites de determinação, foi proposta a avaliação conjunta dos dados obtidos, como possibilidade de

avaliação de informações, sabidamente não representativas, contudo, respaldadas tecnicamente, quanto à aplicabilidade do método desenvolvido.

Desta forma, consideraram-se três amostras individuais de tilápias com idades próximas a seis meses (representando aproximadamente 150 gramas de filé, cada) e 1 amostra constituída por 6 tilápias juvenis (representando aproximadamente 80 g. de filés), as quais foram comumente submetidas às etapas: abate (secção medular), descabeçamento, evisceração e filetagem. As etapas descritas foram realizadas na planta industrial do Laqua, e em suas demais instalações. A etapa de moagem / trituração dos filés foi realizada em processador convencional de alimentos, nas instalações do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, da Faculdade de Farmácia, na UFMG, onde permaneceram refrigeradas a 4 °C até o momento das análises. Das amostras fornecidas, apenas uma das adultas representava grupo de procedência externa, tendo, as demais, nascido e sido criadas nos tanques do Laqua.

A Figura 17A apresenta cromatograma típico de amostras ausentes de analito CAP, e 16B de amostra adicionada de padrão cloranfenicol (concentração 0,03µg/Kg) e padrão interno D5-CAP (concentração 0,15µg/Kg) – tempo de retenção: 2,7 minutos.

A Tabela 13 apresenta os resultados das amostras analisadas, tendo sido comumente verificada a ausência do composto CAP. O critério de identificação e confirmação do composto nas amostras é fundamentado pela presença de picos cromatográficos nas transições monitoradas em modo MRM.



**Figura 17.** A = Cromatograma típico (“Extracted Ion Chromatogram” – XIC) de amostra de tilápia isenta de analito cloranfenicol e B = Cromatograma (“Extracted Ion Chromatogram” – XIC) da amostra adicionada de padrão na concentração correspondente a 0,03µg/Kg

**Tabela 13.** Resultados das amostras aleatórias analisadas

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (µg/Kg)</b>
Adulta 1	n.d.
Adulta 2	n.d.
Juvenis 1	n.d.
Adulta 3	n.d.

Por meio das Instruções Normativas SDA N.º 08, de 30 de março de 2007; SDA N.º 09, de 10 de abril de 2008; Instrução Normativa SDA N.º 15, de 25 de maio de 2009; SDA N.º 06, de 16 de março de 2010; e SDA N.º 06, de 25 de fevereiro de 2011, o Ministério da Agricultura publicou resultados similares, caracterizando amostras de pescado de cultivo, não detectáveis para a pesquisa de cloranfenicol. Tais instruções se referem aos resultados para os anos 2006, 2007, 2008, 2009 e 2010, respectivamente.

## 5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi apresentado um método analítico validado para confirmação e determinação quantitativa de cloranfenicol (CAP) em amostras de tilápias. A faixa linear deste mesmo método variou de 0,03µg/kg a 0,33µg/kg. Observou-se efeito de matriz. O método é altamente seletivo, preciso, exato, e apresenta limites de quantificação e detecção abaixo do LMDR requerido pela Comissão de Decisão 2003/181/EC da Comunidade Europeia, que é de 0,30µg/kg.

Foi empregada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massas em “*tandem*” com ionização por “*electrospray*” (CLAE-ESI/EM/EM), cujos resultados demonstraram ser, esta, uma ferramenta analítica de alta especificidade, detectabilidade e autoconfirmatória para determinação e quantificação de cloranfenicol em pescado.

O método se adéqua ao número de pontos de identificação requeridos pela Comissão de Decisão 2002/657/EC para substâncias com tolerância zero, sendo quatro pontos correspondentes à seleção de um íon precursor e dois íons produtos (duas transições de  $m/z$ ), além do tempo de retenção em coluna cromatográfica.

Vantagens adicionais do método, frente a outros já publicados, incluem curtos tempos de análise (rápida corrida cromatográfica e rápida extração), baixa geração de resíduos (faz uso de água como solvente e como uma das fases móveis), e baixo custo. Particularmente em relação à extração, o procedimento é direto, faz uso de pequenas quantidades de amostra, exclui etapas adicionais de limpeza (tais quais extração em fase sólida), e é mais limpo (faz uso de baixas quantidades de solvente).

Neste trabalho, o número e natureza das amostras aleatórias submetidas analiticamente aos procedimentos propostos fornecem informações não representativas, a despeito de amplo respaldo técnico. Desta forma, a aplicação da metodologia proposta, em avaliações comerciais se faz iminente.

Frente ao disposto na Instrução Normativa SDA N.º 07, de 04 de abril de 2012, publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento, que torna públicos os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes no exercício de 2011, vê-se potencial demanda de extensão do método proposto, para afenicóis adicionais ao cloranfenicol.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB – Applied Biosystems. Applied Biosystems Corporation and MDS Inc: Considerations when using LC/MS/MS Systems with Fast and High Resolution Liquid Chromatography. **Application note**. USA, CA, v. 114AP72-01, n.2, p.5, 2008.
- ABABOUCHE, L.; AFILAL, M.E.; BENABDELJELIL, H.; BUSTA, F.F. Quantitative changes in amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28 °C) and in ice. **International Journal of Food Science and Technology**, London, v.3, n.26, p.297-306, 1991.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO/IEC 8402:1994. **Gestão da qualidade e garantia da qualidade**. Terminologia. Rio de Janeiro, p.15, 1994.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO/IEC 17025:2005. **Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, p.31, 2005.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC Requirements for single laboratory validation of chemical methods**. Gaithersburg, 2002.
- ARANA, L.V. **Aquicultura e desenvolvimento sustentável**. Florianópolis: Editora UFSC, p.310, 1999.
- ASHIE, I.N.A.; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.36, n.182, p.87-121, 1996.
- BARET, V.; LEWIS, T. Outliers in statistical data. **New York: John Wiley**. 3ed. p.604, 1994.
- BASTIAN, R. EPA prefers effluents to be recycled. **Water Farming Journal**, v.28, p.7-10, 1991.
- BAYLISS, P. Chemistry in the kitchen: fish and fish products. **Nutrition and Food Science**, Bradford, v.1, n.1, p.41-43, 1996.
- BERAQUET, N.J.; LINDO, M.M.K. Transformações bioquímicas “post mortem” em pescado. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.22, n.2, p.169-192, 1985.
- BERRIDGE, N.J. Penicillin in milk – I: the rapid routine assay of low concentrations of penicillin in milk. **Journal of Dairy Reviews**, v.23, p.336-341, 1956.

- BERRY, D.J. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of chloramphenicol in small biological samples. **Journal of Chromatography**, v.385, p.337-341, 1987.
- BORIES, G.F.; PELERAN, J.C.; WAL, J.M. Liquid chromatographic determination and mass spectrometric confirmation of chloramphenicol residues in animal tissues. **The Journal of AOAC International**, v.66, p.1521-1526, 1983.
- BOSCARDIN-BORGHETTI, N.R.; OSTRENSKI, A.; BORGHETTI, J.R. **Aquicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. Curitiba: Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, p.128, 2003.
- BOTSOUGLOU, N.A.; FLETOURIS, D.J. **Antibacterial drugs, drugs residues in foods pharmacology, food safety, and analysis**. New York: Marcel Dekker, p.85–94, 2001.
- BOYD, C.E. **Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level: Aquaculture**. Amsterdam, v.226, p.101-112, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 07 de 04 de abril de 2012. **Diário Oficial da União**. s.1. n.67. p.14-15. Brasília. 05 de Abril de 2012a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 09 de 30 de mar. de 2007. Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carne (Bovina, Aves, Suína e Eqüina), Leite, Mel, Ovos e Pescado do exercício de 2007. **Diário Oficial da União**. Brasília, p.7, 04 abr., 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 42 de 20 de dez. de 1999. Plano nacional de controle de resíduos em produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**. Brasília, p.213-227, 22 dez. 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 50 de 20 de fev. de 2006. **Diário Oficial da União**. Brasília, p.15, 03 mar. 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 51 de 06 de fev. de 1986. **Diário Oficial da União**. Brasília, p.228, 07 fev. 1986.

- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCR**. Abril de 2012b. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Validação de Métodos Bioanalíticos: Esclarecimentos Sobre a Aplicação da RE Nº 899/2003**. Unidade de Avaliação de Estudos de Biodisponibilidade/Bioequivalência de Medicamentos – UABBE. Gerência Geral de Medicamentos – GGMED. Brasília, n.1, p.6. 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.3.087, de 07 de out. de 2010. **Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt3087\\_07\\_10\\_2010.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt3087_07_10_2010.html)**
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVET – Relatório 2006-2007: Monitoramento de Resíduos em leite Exposto ao Consumo (5º e 6º anos de atividade)**. Gerência-Geral de Alimentos. Brasília, p.76. n.1, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE Nº 899, de 29/05/2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm). 2003
- BRITO, M.A.V.P. Resíduos de antimicrobianos no leite. **Circular Técnica Embrapa Gado de Leite**, n.60, p.20, 2000.
- BROWN, M.B.; FORSYTHE, A.B. Robust tests for equality of variances. **Journal of the American Statistical Association**, v.69, p.364-367, 1974.
- BURKE, S. **Missing values, outliers, robust statistics and non-parametric methods: LC GC**. v.59, p.19-24, 2001.
- CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2.ed., p.208, 2003.
- CEE – COMUNIDADE ECONÓMICA EUROPÉIA. **Regulamento CEE n. 2377/90**. Conselho das Comunidades Europeias, de 26 de Junho de 1990. JO L 224. p.1. 1990.
- CEDAP – Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca (Cedap). Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Piscicultura: Síntese informativa da atividade no estado de Santa Catarina**. Florianópolis, v.1, n.1, p.8, 2011.

- CHAGAS, E.C.  **$\beta$ -Glucano e Nucleotídeos para Tambaquis (*Colossoma macropomum*) Vacinados e Desafiados com *Aeromonas hidróphila*: Desempenho Produtivo e Respostas Fisiopatológicas.** Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal. São Paulo, 2010
- CODEX ALIMENTARIUS. **Resíduos de medicamentos veterinários en los alimentos.** Roma, 2ed., v.3, 1993.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. **Introdução a métodos cromatográficos.** Campinas: Editora UNICAMP, v.7, p.279, 1997.
- CONCORDET, D.; TOUTAIN, P.L. The withdrawal time estimation of veterinary drugs a non-parametric approach. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapy**, v.20, p.374-379, 1997.
- CORPET D.E.; BRUGERE H.B.: Résidus antibiotiques dans les aliments d'origine animale: conséquences microbiologiques, évaluation de la dose sans effet chez l'homme. **Revue de Medecine Veterinaire**, v.2, n.146, p.73-82, 1995.
- COSTA, E.O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Higiene Alimentar**, v.10, n.44, p.15-17, 1996.
- COUNCIL DIRECTIVE 96/23/EC, 1996, April, 1996. Measures to Monitor Certain Substances and Residues Thereof in Live Animals and Animal Products. **Official Journal of the European Communities**, L125, p.10–32, 1996.
- CRESCÊNIO, R. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil: Ictiofauna brasileira e seu potencial para a criação.** BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. Santa Maria: UFSM. c.1, p.2-36, 2005.
- CYRINO, J. E. P.; BICUDO, A.J.A.; SADO, R.Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K. Nutrição de peixes e o meio ambiente. **SIMPOSIO DE NUTRIÇÃO E SAUDE DE PEIXES.** Botucatu, São Paulo, p.103-119, 2005.
- DA SILVA, B.C. **Resposta hematológica e imunológica de tilápia do Nilo após aplicação de vacina polivalente por banho de imersão, injeção intraperitoneal e administração oral.** Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Santa Catarina, p.34, 2008.
- DA SILVA, J.R.; SILVA, L.T.; DRUZIAN, J.I. Otimização e validação intralaboratorial de método para análise de resíduos de cloranfenicol em leite caprino por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (CG/DCE). **Química Nova**, São Paulo, v.33, n.1, 2010

- DURBIN, J.; WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least square regression. **Biometrika**, v.38, p.159-178, 1951.
- EC – EUROPEAN COMMISSION. Commission decision 2002/657/EC: Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, v.221. p.8-36. Aberdeen, United Kingdom, August, 2002.
- EC – EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision 2003/181/EC: Amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin (Text with EEA relevance). **Official Journal of the European Communities**. L221. p.8-36. Aberdeen, United Kingdom. March, 2003.
- EC – EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation 1442/95, 1995, of 26 June 1995 amending annexes I, II, III and IV to regulation (EEC) No. 2377/90 laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Communities**, L143, p. 26–30, 1995.
- EFFKEMANN, S. **Bestimmung von Chloramphenicol in Fischen mittels RP-HPLC mit massenspektrometrischer Detektion. Prüfvorschrift LC-MS002.** LAVES, Cuxhaven, Germany, 2005.
- EMA – European Medicines Agency. Committee for Veterinary Medical Products. **Summary Report: Florfenicol: Extension to all food producing species.** EMA/MRL/882/02-Final. January, 2002.
- EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics.** p.61,1998.
- FAO – Food and Agriculture Organization. **Disponível em <http://www.fao.org>.** Acesso em 21 de Abril, 2008.
- FAO/WHO – Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Forty-second Meeting of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives, Chloramphenicol Monograph, **FAO Food and Nutrition Paper**, n.41, p.6. Rome, 1994.
- FAURE, O. Detection des antibiotiques: vers l'évolution de la method officielle. **Revue Française Laitiere**, n.578, p.28-30, 1998.

- FERGUSON, J.; BAXTER, A.; YOUNG, P.; KENNEDY, G.; ELLIOTT, C.; WEIGEL, S.; GATERMANN, R.; ASHWIN, H.; STEAD, S.; SHARMAN, M. Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex® kit chloramphenicol. **Analytical Chimica Acta**, Amsterdam, v.529, n.1-2, p.109-113, 2005.
- FISCH, R.D. Withdrawal time estimation of veterinary drugs: existing the range of statistical methods. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapy**, v.23, p.159-162, 2000.
- FITZPATRICK, S.C.; VILIM, A.; LAMBERT, G.; YOUNG, M.S.; BRYNS, D. Dietary intake estimatives as an means to the harmonization of maximum residue levels for veterinary drugs. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.24, p.177-183, 1996.
- FRANCO, D.A.; WEB, B.J.; TAYLOR, C.L. Antibiotics and sulphonamides residues in meat: implications for human health. **Journal of Food Protection**, v.53, p.178-185, 1990.
- FRANKLIN, T.J.; SNOW, G.A. **Biochemistry of Antimicrobial Action**. New York: Chapman and Hall, 4.ed., p.128. 1989.
- GANTVERG, A.; SHISHANI, I.; HOFFMAN, M. Determination of chloramphenicol in animal tissues and urine liquid chromatography-tandem mass spectrometry versus gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.483, p.125-135, 2003.
- GENTELINI, A.L. **Tratamento de efluente de piscicultura orgânica utilizando macrófitas aquáticas *Eichhornia crassipes* (mart. Solms) e *Egeria densa* (Planchon.)**. Escola de Engenharia Agrícola da UNIOESTE. Cascavel. p.81, 2007.
- GIKAS, E.; KORMALI, P.; TSIPI, D.; TSARBOPOULOS, A. Development of a rapid and sensitive SPE-LC-ESI MS/MS method for the determination of chloramphenicol in Seafood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.5, p.1025-1030, 2004.
- GRANJA, R. Drogas veterinárias e antibióticos. Um panorama geral em carnes. **5º Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição**, Santa Catarina, 2004.
- GRUBBS, F. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, v.11, p.1-21, 1969.

- GUDE, T.; PREISS, A.; RUBACH, K. Determination of chloramphenicol in muscle, liver, kidney and urine of pigs by means of immunoaffinity chromatography and gas chromatography with electron capture detection. **Journal of Chromatography B**, v.673, p.197-204, 1995.
- GUIDI, L.R. Aminas bioativas em molho de soja: validação de método e ocorrência. Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, MG. Brasil. v.1, p.90, 2010.
- GUSTAFSON, R.H. Antibiotic residues in meat and milk: use of antibiotics in livestock and human health concerns. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.1428-1432, 1991.
- GUY, P.A.; ROYER, D.; MOTTIER, P.; GREMAUD, E.; PRISSET, A.; STADLER, R.H. Quantitative determination of chloramphenicol in milk powders by isotope dilution liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1054, n.1-2, p.365-371, 2004.
- HATHCOCK, J.N. Nutritional Toxicology. **New York: Academic Press**, v.1, p.515, 1982.
- HEIN, G.; BRIANESE, R.H. **Modelo EMATER de Produção de Tilápia**. EMATER - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural. Toledo, Paraná, Novembro, 2004.
- HIGIENE ALIMENTAR. **Programa de controle de resíduos em pescado (Perp)**. Disponível em <http://www.higienealimentar.com.br/revista/ed143/edito.htm> Acesso em 03 de Agosto. 2008.
- HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. **Analytical Chemistry**, v.54, p.67A-76A, 1982.
- HORWITZ, W. Protocol for design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure and Applied Chemistry**, v.67, p.331-343, 1995.
- HUSS, H.H.; REILLY, A.; EMBAREK, P.K.B. Prevention and control of hazards in seafood. **Food Control**, v.11, p.149-156, 2000.
- C. HUMMERT, C.; LUCKAS, B.; SIEBENLIST, H. Determination of Chloramphenicol in Animal Tissue Using High-Performance Liquid Chromatography with a Column Switching System and Ultraviolet Detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.668, n.1, p.53-58, 1995.
- IAL – Instituto Adolfo Lutz. Pescado e conserva de pescado. In: **Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos**. São Paulo, 3.ed., v.1, p.210-212, 1985.
- IARC – International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **Pharmaceutical Drugs**, Lyon, v.50, p.415, 1990.

- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatísticas da Pesca 2000**, Brasília, DF. n.1, v.1, p.12. 2001.
- ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Validation of analytical procedures**. Geneve, 1996.
- IMPENS, S.; REYBROECK, W.; VERCAMMENC, J.; COURTHEYN, D.; OOGHE, S.; WASCH, K.; SMEDTS, W.; BRBANDER, H. Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC–MS<sup>2</sup> and LC–MS<sup>2</sup>. **Analytica Chimica Acta**, v.483, p.153–163, 2003.
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. 2007. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. 2.ed., p.25. 2007.
- JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. Artmed, 6<sup>a</sup> ed., p.712, 2005.
- JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I General concepts and guidelines. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v.19, p.719-736, 1996.
- JORNAL DA UNICAMP. Sala de Imprensa. Tese **Disponível em [http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp\\_hoje/ju/fevereiro2008/ju386pag09.html](http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/fevereiro2008/ju386pag09.html)** Acesso em 23 de Julho. 2008.
- KEUKENS, H.J.; AERTS, M.M.L.; TRAAG, W.A. Analytical strategy for the regulatory control of residues of chloramphenicol in meat: preliminary studies in milk. **The Journal of AOAC International**, v.75, p.245-256, 1992.
- LANARA – Laboratório Nacional de Referência Animal do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes**. Brasília, v.2, c.11. 1981.
- LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Editora Rima, p.62, 2004.
- LAWRENCE, K.; OWEN, J.; COLLINS, D.; LEWSEY, D. Residues. **The Pig Journal**, v.37, p.27-30, 1996.
- LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I.; GHURYE, S.G.; HOEFFDING, W.; MADOW, W.G.; MANN, H.B. (Ed.) Contributions to probability and statistics. **Stanford University Press**, Stanford, p.278-292, 1960.

- LI, T.L.; CHUNG-WANG, Y.J. SHIH, Y.C. Determination and confirmation of chloramphenicol residues in swine muscle and liver. **Journal Food Science**, v.67, p.21-28, 2001.
- LUCAS, A.P. Pesque-pague, uma renda extra para os piscicultores. **Manchete Rural**, Rio de Janeiro, n.97, p.6-10, 1995.
- MARENGONI, N.G. **Produção de Tilápia do Nilo Oreochromis niloticus (linhagem chitralada), cultivada em tanques-rede, sob diferentes densidades de estocagem**. Archivos de Zootecnia. Universidade de Córdoba, Espanha, v.55, n.210, p.127-138, 2006.
- MARTIN, B.S.; MORAGA, R. Evaluación de la técnica microbiológica con Bacillus subtilis BGA para la identificación de residuos de antimicrobianos en leche bovina. **Avances en Ciencias Veterinarias**, v.10, p.43-48, 1996.
- MARTIN, C. A.; DE ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R.; VISENTAINERI, J.E.L.; MATSHUSHITA, M.; DE SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V.. Ácidos graxos poliinsaturados Omega-3 e Omega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista Nutrição**, v.19, n.6, 2006.
- MARTINS JUNIOR, H.A.; BUSTILLOS, O.V.; PIRES, M.A.F.; LEBRE, D.P.; WANG, A.Y. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em "tandem" (CLAE-EM/EM). **Química Nova**, v.29, n.3, p.586-592, 2006.
- MCEVOY, J.D.G.; MAYNE, C.S.; HIGGINS, H.C.; KENNEDY, D.G. Transfer of chlortetracycline from contaminated feeding stuff to cows milk. **The Veterinary Record**, v.22, p.102-106, 2000.
- MENDES, E. S.; ALVES, C. A. B.; BEZERRA, S. S.; MENDES, P. P.; SANTOS, F. L. Sensibilidade in vitro à enrofloxacin e oxitetraciclina de vibrios isolados na larvicultura de camarão marinho (Litopenaeus vannamei). **Revista Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, Pernambuco, v.7, n.2-, p.90-97, 2004
- MERCADO DA PESCA. Disponível em <http://www.mercadodapesca.com.br>. Acesso em 10 de Setembro. 2008.
- MILHAUD, G.; PERSON, J.M. Évaluation de la toxicité des résidus d'antibiotiques dans le lait. **Recueil de Medecine Veterinaire**, v.157, n.2, p.179-185, 1981.

- MITCHELL, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; MCEWEN, S.A.; MCNAB, W.B.; YEE, A. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. **Journal of Food Protection**, v.61, n.6, p.742-745, 1998.
- MOTA, R.A.; DA SILVA, K.P.C.; FREITAS, M.F.L.; PORTOL, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.42, n.6, 2005.
- MOTTIER, P.; PARISOD, V.; GREMAUD, E.; GUY, P.A.; STADLER, R.H. Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography—electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.994, p.75-84, 2003.
- MPA – MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura – Brasil**. Brasília, n.1. p.129. 2010.
- MUNNS, R.K.; HOLLAND, D.C.; ROYBAL, J.E.; STOREY, J.M.; LONG, A.R.; STEHLY, G.R.; PLAKAS, S.M. Gas chromatographic determination of chloramphenicol residues in shrimp: Interlaboratory study. **The Journal of AOAC International**, v.77, p.596-601, 1994.
- NACA/FAO – NETWORK OF AQUACULTURE CENTRES IN ASIA-PACIFIC – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Desenvolvimento da aquicultura para o além de 2000**. Declaração de Bangkok e estratégia. Conferência sobre aquicultura no Terceiro Milênio, 20-25 de fevereiro de 2000. Bangkok, Tailândia. NACA, Bangkok / FAO, Roma, p.22, 2000.
- NEUHAUS, B.K.; HURLBUT, J.A.; HAMMACK, W. LC/MS/MS analysis of chloramphenicol in shrimp. **U.S. FDA: Laboratory Information Bulletin**, n.4290, v.18, 2002.
- NOGUEIRA, A.C. RODRIGUES, T. **Criação de tilápias em tanques-rede - Cadeia Produtiva da Tilápia**. SEBRAE - Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Salvador, Bahia, p.23, 2007.
- NUNES, A.M.N. Qualidade dos pescados – parte II. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.8, n.32, p.5-9, 1994.

- OLIVEIRA, A.A.F., MOTA, R.A., SOUZA, M.I.; SÁ, M.E.P. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro frente a amostras de *Staphylococcus* spp isoladas de mastite subclínica bovina, no agreste maridional de Pernambuco. **A Hora Veterinária**, v.22, n.127, p.8-10, 2002.
- OLIVEIRA, B.R.B. **Validação e aplicação de método para determinação de oxitetraciclina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em camarão**. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE. 2008.
- OLIVEIRA, R.C. de; BANDO, E.; JUNIOR, M.M. Ocorrência de cloranfenicol em leite pasteurizado comercializado no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum. Health Science*, Maringá, v.29, n.1, p.59-62, 2007.
- PALERMO-NETO, J. Resíduos de antimicrobianos em alimentos. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.7, p.65-71, 2001.
- PANETTA, J.C.; DIAS, E.R.; ZICAN, C.A.; SANTANA, R. Saúde pública e aquicultura. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.9, n.36, p.6-7, 1995.
- PASCHOAL, J.A.R., RATH, S., AIROLDI, F. P. S., REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.5, 2008.
- PENNEY, L.; SMITH, A.; COATES, B.; WIJEWICKREME, A. Determination of chloramphenicol residues in milk, eggs, and tissues by liquid chromatography/mass spectrometry. **The Journal of AOAC International**, v.85, p.645-53, 2005.
- PEREZ, N.; GUTIERREZ, R.; NOA, M.; DIAZ, G.; LUNA, H.; ESCOBAR, I.; MUNIVE, Z. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamides, nitrofurans, and chloramphenicol residues in pasteurized milk. **The Journal of AOAC International**, v.85, p.20-24, 2002.
- PEREZ, R.A.; IGLESIAS, M.T.; PUEYO, E. Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.55, p.360-365, 2007.
- PESCA BRASIL. Disponível em <http://www.pescabrasil.com.br/aquicultura.asp>. Acesso em 03 de Setembro. 2008.
- PFENNING, A.P.; MADSON, M.R.; ROYBAL, J.E.; TURNIPSEED, S.B.; GONZALES, S.A.; HURLBUT, J.A. SALMON, G.D. Simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol residues in milk by gas chromatography with electron capture detection. **The Journal of AOAC International**, v.81, p.714-720, 1998.

- PFENNING, A.; TURNIPSEED, S.; ROYBAL, J.; BURNS, C.; MADSON, M.; STOREY, J.; LEE, R. Confirmation of multiple phenicol residues in shrimp by electrospray LC-MS. **U.S. FDA: Laboratory Information Bulletin**, n.4284, v.18, 2002.
- PFENNING, A.; TURNIPSEED, S.; ROYBAL, J.; MADSON, M.; LEE, R.; STOREY, J. Confirmation of chloramphenicol residue in crab by electrospray LC/MS. **U.S. FDA: Laboratory Information Bulletin**, n.4294, v.19, 2003.
- PITTELA, C.M. **Determinação de resíduos de agrotóxicos em mel de abelhas (Apis sp) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**. Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Belo Horizonte, p.117, 2009.
- PORFÍRIO, T.A. Resíduos em carne. **Higiene Alimentar**, v.8, p.26-29, 1994.
- POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J.; NIEDZIELSKA, J. Evaluation of sample preparation for control of chloramphenicol residues in porcine tissues by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.483, p.307-311, 2003.
- POTT, M. Milk “antibiotic” residues: a pharmaceutical company view. **Cattle practice**, v.8, p.287-292, 2000.
- RAMOS, M.; MUÑOZ, P.; ARANDA, A.; RODRIGUEZ, I.; DIAZ, R.; BLANCA, J. Determination of chloramphenicol residues in shrimps by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.791, p.31-38, 2003.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
- RONNING, H.T.; EINARSEN, K.; ASP, T.N. Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v.1118, p.226–233, 2006.
- RYAN, T.A.; JOINER, B.L. **Normal Probability Plots and Test for Normality**. The State College: Pennsylvania State University, p.15, 1976.
- ROYBAL, J.E. Chloramphenicol and Related Drugs. In: TURNIPSEED, S.B.; LONG A.R. Analytical procedures for drug residues in food of animal origin. West Sacramento: **Science Technology System**, p.227, 1998.

- RUPP, H.S.; STUART, J.S.; HURLBUT, J.A. LC/MS/MS analysis of chloramphenicol in crab meat. **U.S. FDA: Laboratory Information Bulletin**. n.430, v.19, 2003.
- SAAVEDRA, M.J.; BRITO, R.D.; SOUZA, M.; ALVES, A.; REMA, P. Isolamento de *Pasteurella* spp. e *Vibrio* spp. em robalos (*Dicentrarchus labrax*): susceptibilidade a diferentes grupos de antibióticos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.2, 2004.
- SANDERS, P.; GUILLOT, P.; DAGORN, M.; DELMAS, J.M. Liquid chromatographic determination of chloramphenicol in calf tissues: studies of stability in muscle, kidney and liver. **The Journal of AOAC International**, v.74, p.483-486, 1991.
- SÃO PAULO. Código sanitário. Pescado NTA 9. Decreto nº12486 de 20 de outubro de 1978. **São Paulo: Imprensa Oficial do Estado**. p.169-170, 1978.
- SASSAKI, L.A., RIBEIRO, P. Intoxicação histamínica por pescado. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.5, n.18, p.20-23, 1991.
- SEAP – Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca. **Disponível em <http://www.presidencia.gov.br/seap>**. Acesso em 20 de agosto. 2008.
- SEBRAE – SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. Aquicultura e pesca: Tilápias. **Sumário Executivo – Estudo de Mercado SEBRAE/ESPM**. Brasília, DF, n.1, p.46, 2008.
- SERRANO, P.H. FAO Responsible use of antibiotics in aquaculture. **Fishers Technical Paper**, Rome, v.1, n.469, p.97, 2005
- SILVA, T.M. **Otimização e validação do método para determinação de histamina em pescado**. Faculdade de Farmácia da UFMG. p.179, 2008.
- SIMÕES, F.S.; YABE, M.J.S.; MOREIRA, A.B.; BISINOTI, M.C. Avaliação do efeito da piscicultura em sistemas aquáticos em Assis e Cândido Mota, São Paulo, por indicador de qualidade da água e análise estatística multivariada. **Química Nova**, v.30, n.8, p.1835-1841, 2007.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; BARROS, A.F.; BRAGA, F.M.S. Effects of floating macrophyte cover on the water quality in fishpond. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.25, n.1, p.101-106, 2003.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; FAVERO, E.G.P.; BRAGA, F.M.S. Utilization of macrophyte biofilter in effluent from aquaculture: I. floating plant. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.62, n.4, 2002.

- SIQUEIRA, S.R.R. **Development and validation of analytical method for the determination of chloramphenicol in food of animal origin by LC-ESI-MS-MS.** Campinas, p.86, 2007.
- SOUZA, S.V.C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos.** Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. p.296, 2007.
- SOUZA, S.V.C.; BRITTO, R.B. Validação de métodos: aplicação em análises de resíduos em alimentos. **Encontro para a Qualidade de Laboratórios - REMESP.** São Paulo, p.155-163, 2002.
- SOUZA, S.V.C.; SILVA, G.; DINIZ, M.H.G.M. Determinação de resíduos de nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina e tecidos de origem animal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.1, p.34-38, 2001.
- STOREY, J.; PFENNING, A.; TURNIPSEED, S.; NANDREA, G.; LEE, R.; BURNS, C.; MADSON, M. Determination of chloramphenicol residues in shrimp and crab tissues by electrospray triple quadrupole LC/MS/MS. **U.S. FDA: Laboratory Information Bulletin**, n.4306, v.19, 2003.
- STUART, J.S.; RUPP, H.S. HURLBUT, J.A. LC/MS/MS Analysis of chloramphenicol in crawfish meat. **U.S. FDA: Laboratory Information Bulletin**, n.4303, v.19, 2003.
- SUMAGAYSAY-CHAVOSO, N.S.; SAN DIEGO-McGLONE, M.L. Water quality and holding capacity of intensive and semi-intensive milkfish (*Chanos chanos*) ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v.219, p.413-429. 2003.
- TACON, A.G.J.; FORSTER, I.P. Aquafeeds and the environment: policy implications. **Aquaculture**, Amsterdam, v.226, p.181-189, 2003.
- TAYLOR, S.L. Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods. Genebra, **World Health Organization**, p.1-45, 1985.
- THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. **Analyst**, v.125, n.3, p.385-386, 2000.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, p.835-855, 2002.

- TURNIPSEED, S.; BURNS, C.; STOREY, J.; LEE, R.; PFENNING, A. Confirmation of multiple phenicol residues in honey by electrospray LC/MS. **U.S. FDA: Laboratory Information Bulletin**, n.4281, v.18, 2002.
- VAN DE REIT, J.M.; POTTER, R.A.; CHRISTIE-FOUGERE, M.; BURNS, B.G. Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in farmed aquatic species by liquid chromatography/mass spectrometry. **The Journal of AOAC International**, v.86, p.510-4, 2003.
- VAN GINKEL, L.A.; VAN ROSSUM, H.J.; ZOONTJES, P.W.; VAN BLITTERSWIJK, H.; ELLEN, G.; VAN DER HEEFT, E.; DE JONG, A.P.J. M.; ZOMER, G. Development and validation of a gas chromatographic-mass spectrometric procedure for the identification and quantification of residues of chloramphenicol. **Analytica Chimica Acta**, v.237, p.61-69, 1990.
- VIEIRA, R.H.S.F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. Varela. São Paulo, p.380, 2004.
- WHITE, C.R.; MOATS, W.A.; KOTULA, K.L. Optimization of a liquid chromatographic method for determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk. **Journal of the Association of Official and Analytical Chemists International**, v.76, n.3, p.549-555, 1993.
- WHO – **Food Additives Series: 53 CHLORAMPHENICOL**. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v53je03.htm>. Acessado em 10/08/2008.
- WOODWARD, K.N. The use of microbiological end-points in the safety evaluation and elaboration of maximum residue limits for veterinary drugs intended for use in food producing animal. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy**, v.21, p.47-53, 1998.
- ZANIBONI-FILHO, E.O desenvolvimento da piscicultura brasileira sem a deterioração da qualidade de água. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v.57, n.1, p.3-9, 1997.
- ZIMMERMAN, S.; HASPER, T.O.B., Psicultura no Brasil: o processo de intensificação da tilapicultura. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Santa Maria, Rio Grande do sul, 2003.