

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**PALOMA NASCIMENTO DOS SANTOS**

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO  
DE ANTIMICROBIANOS EM PESCADO POR  
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

**Recife, PE  
Março, 2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**PALOMA NASCIMENTO DOS SANTOS**

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO  
DE ANTIMICROBIANOS EM PESCADO POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. **Maria Inês Sucupira Maciel**

Co-Orientador: Prof. Dr. **Eden Cavalcanti de Albuquerque Junior**

**Recife, PE**

**Março, 2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

Santos, Paloma Nascimento dos

Validação de Metodologias para Determinação de Antimicrobianos em Pescado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência / Paloma Nascimento dos Santos.

Recife: [s.n], 2009. XXf.

Dissertação (Curso de Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

1. Validação. antimicrobianos. CLAE. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE  
ANTIMICROBIANOS EM PESCADO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA  
DE ALTA EFICIÊNCIA**

**Por: Paloma Nascimento dos Santos**

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de **Mestre em Química** e aprovada em \_\_/\_\_/\_\_\_\_ pelo Programa de Pós-Graduação em Química, em sua forma final.

---

Prof. Dr. Celso de Amorim Camara  
Coordenador do Programa

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Inês Sucupira Maciel - Orientadora  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. André Fernando Lavorante - Membro interno  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. Eden Cavalcanti de Albuquerque Junior - Membro externo  
Instituto de Tecnologia de Pernambuco

---

Prof. Dr. Adriano Nunes Cunha - Membro externo  
Instituto de Tecnologia de Pernambuco

À Edna, Brenda e Edésio (*in memoriam*) pela vida toda.

À Beatriz Oliveira, a melhor de todas.

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha família, em especial aos tios Eliezer, Eurides, Elias e Enildo por todo incentivo à minha educação.

À Profa. Dra. Maria Inês Sucupira Maciel, orientadora deste trabalho, pelo exemplo de pesquisadora e por todo o suporte dado nesta caminhada.

Ao Prof. Dr. Eden Cavalcanti de Albuquerque Junior por ser mais que um co-orientador, por toda a compreensão, apoio e ensinamentos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Departamento de Química, especialmente à pessoa do coordenador Prof. Dr. Celso de Amorim Camara sempre preocupado com a qualidade da nossa formação acadêmica.

Ao Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP) pela formação profissional e disponibilização da estrutura necessária para a realização deste trabalho.

À professora Dra. Terezinha de Jesus Rangel Camara por todas as conversas incentivadoras.

A todos os colegas do Mestrado, especialmente à amiga Isabel Cristina Solano Guerra pela agradável convivência.

Aos amigos do Laboratório de Contaminantes Químicos e Biológicos (LEMI): Dr. Antônio Travassos Júnior, Henrique Marinho, Tarciana Leonídio, Mônica Couto e Jamile Gomes, e a Flávio Gervásio, pelo apoio e risadas.

A todos os professores do Mestrado, especialmente os professores Valberes Bernardo do Nascimento, Roberto de Vasconcelos Antunes, João Rufino de Freitas Filho e Egídio Bezerra Neto.

À funcionária Ana Amâncio pela presteza e simpatia sempre.

A todos que entenderam os silêncios e ausências e me ajudaram quando era necessário falar sobre este trabalho e quando não.

## RESUMO

Antimicrobianos são largamente empregados na medicina veterinária e resíduos destes podem permanecer nos alimentos de origem animal, acima de valores considerados seguros, gerando riscos para a saúde humana e para o meio ambiente. O objetivo deste trabalho foi validar metodologias para determinação de sulfonamidas em camarão e florfenicol em camarão e tilápia utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência como técnica analítica. A determinação de sulfonamidas em camarão foi realizada usando uma coluna C18 e fase móvel composta por ACN;Água (25:75) em método gradiente. A amostra foi extraída utilizando acetonitrila e filtrada em sulfato de sódio anidro. Após a evaporação, foi feito um *clean up* em cartuchos de troca iônica (500 mg/6mL) seguida de evaporação do solvente até *secura* e posterior ressuspensão ácido acético 0,5% para filtração e análise por CLAE. Para a determinação de florfenicol em camarão e tilápia também foi utilizada uma coluna C18 e método isocrático. A extração foi realizada com acetato de etila, seguido de centrifugação e extração da gordura com hexano. Após uma segunda centrifugação, a fase superior foi descartada e a fase aquosa filtrada e levada para análise por CLAE. A metodologia para determinação de sulfonamidas mostrou-se seletivo e linear para uma faixa de trabalho de 100 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$  e apresentou limites de detecção e quantificação para a sulfatiazol de 6,35 e 20,19, para a sulfametazina 2,44 e 7,76, para a sulfametoxazol 0,58 e 1,83, para a sulfadimetoxina 1,49 e 4,75 e para a sulfaquinoxalina 3,41 e 10,85  $\mu\text{g kg}^{-1}$  respectivamente. A metodologia para determinação de florfenicol mostrou-se seletivo e linear para uma faixa de trabalho de 0,1 a 3,0  $\text{mg L}^{-1}$  e o limite de detecção e quantificação do método para a matriz camarão foram 2,97 e 15,01  $\mu\text{g kg}^{-1}$  respectivamente. Para a matriz tilápia as menores concentrações detectadas e quantificadas pelo método foram de 3,64 e 18,54  $\mu\text{g kg}^{-1}$  respectivamente. Os métodos validados mostraram-se adequados para a determinação dos antimicrobianos citados e todos os resultados encontram-se em conformidade com a legislação vigente.

Palavras-chave: Validação, Sulfonamidas, Florfenicol,, CLAE.



## ABSTRACT

Antimicrobials are widely used in veterinary medicine and these residues may remain in food of animal origin, above values considered safe, creating risks to human health and the environment. This work was validate methodologies for determination of sulfonamides in shrimp and florfenicol in shrimp and tilapia using High Performance Liquid Chromatography as analytical technique. The determination of sulphonamides in shrimp was accomplished using a C18 column and mobile phase composed of ACN:water (25:75) in gradient method. The sample was extracted using acetonitrile and filtrate on anhydrous sodium sulphate. After evaporation, was a clean up in ion exchange cartridges (500 mg/6mL) followed by evaporation of the solvent to dryness and subsequent resuspension in acetic acid 0.5% for filtration and analysis by HPLC. The determination of florfenicol in shrimp and tilapia was also used a C18 column and isocratic method. The extraction was performed with ethyl acetate, followed by centrifugation and extraction of fat phase with hexane. After a second centrifugation, the upper phase was discarded and the aqueous phase filtered and taken for analysis by HPLC. The methodology for determination of sulfonamides was shown to be selective and linear for a range of work from 100 to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ . The LOD and LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) was 6.35 and 20.19 to sulfathiazole, 2.44 and 7.76 for sulfamethazine, 0.58 and 1.83 for sulfamethoxazole, 1.49 and 4.75 for sulfadimethoxine and 3.41 and 10.85 for sulfaquinoxaline. The methodology for determining florfenicol shown to be selective and linear for a range of work from 0.1 to 3.0  $\text{mg L}^{-1}$  and the LOD and LOQ ( $\text{mg L}^{-1}$ ) to matrix shrimp were 2.97 and 15.01  $\text{mg kg}^{-1}$  respectively. For tilapia matrix the lowest concentrations detected and quantified by method, were 3.64 and 18.54  $\text{mg kg}^{-1}$  respectively. All results are in accordance with applicable law for the determination of antimicrobial by HPLC.

**Keywords:** Validation, Sulphonamides, Florfenicol, HPLC.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas químicas das sulfonamidas (SAs).....	20
<b>Figura 2.</b> Estruturas químicas dos anfenicóis.....	22
<b>Figura 3.</b> Diagrama descrevendo a separação por eluição em coluna.....	31
<b>Figura 4.</b> Componentes de um sistema cromatográfico.....	42
<b>Figura 5.</b> Componentes de um sistema cromatográfico.....	43
<b>Figura 6.</b> Cromatograma típico para a solução padrão de sulfonamidas a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ .....	55
<b>Figura 7.</b> Cromatograma típico para a solução padrão de florfenicol a $1 \text{ mg L}^{-1}$ .....	55
<b>Figura 8.</b> Cromatogramas típicos para sulfonamidas em camarão. (A) Solução padrão a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ; (B) Branco da matriz; (C) Matriz fortificada a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ .....	57
<b>Figura 9.</b> Cromatograma típico para matriz <u>camarão</u> : (A) Branco da matriz; (B) Solução padrão de florfenicol a $1 \text{ mg L}^{-1}$ ; (C) Matriz fortificada a $1 \text{ mg L}^{-1}$ .....	59
<b>Figura 10.</b> Cromatograma típico para matriz <u>peixe</u> : (A) Branco da matriz; (B) Solução padrão de florfenicol a $1 \text{ mg L}^{-1}$ ; (C) Matriz fortificada a $1 \text{ mg L}^{-1}$ .....	59
<b>Figura 11.</b> Curvas analíticas para as sulfonamidas em solução de ácido acético 0,5% (valores médios de razão de área obtidos).....	64
<b>Figura 12.</b> Curvas analíticas para as sulfonamidas no extrato da matriz fortificada (valores médios de razão de área obtidos).....	65
<b>Figura 13.</b> Curvas analíticas para o florfenicol em solução e no extrato fortificado das matrizes (valores médios de razão de área obtidos).....	67
<b>Figura 14.</b> Gráficos de faixa linear dinâmica para as sulfonamidas no extrato da matriz.	69

<b>Figura 15.</b> Gráficos de faixa linear dinâmica para o florfenicol em camarão e tilápia.....	70
<b>Figura 16.</b> Representação gráfica das curvas analíticas para as sulfonamidas.....	72
<b>Figura 17.</b> Representação gráfica das curvas analíticas para o florfenicol em tilápia e camarão.....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Antimicrobianos e seus LMR estabelecidos.....	24
<b>Tabela 2a.</b> Métodos por CLAE utilizados para determinação de sulfonamidas em produtos animais.....	27
<b>Tabela 2b.</b> Métodos por CLAE utilizados para determinação de sulfonamidas em produtos animais.....	28
<b>Tabela 3.</b> Métodos para determinação de florfenicol em produtos animais.....	30
<b>Tabela 4.</b> Classificação dos métodos cromatográficos em coluna.....	32
<b>Tabela 5.</b> Detectores usados na cromatografia líquida de alta eficiência.....	34
<b>Tabela 6.</b> Comparação entre parâmetros de validação dos principais órgãos regulamentadores.....	36
<b>Tabela 7.</b> Padrões analíticos utilizados e especificações.....	44
<b>Tabela 8.</b> Condições cromatográficas utilizadas para a detecção e quantificação dos antimicrobianos.....	46
<b>Tabela 9.</b> Valores de F calculados e tabelados para cada sulfonamida.....	58
<b>Tabela 10.</b> Valores de t calculados e tabelados (95%) para cada sulfonamida.....	58
<b>Tabela 11.</b> Valores de F calculados e tabelados para o florfenicol.....	60
<b>Tabela 12.</b> Valores de t calculados e tabelados (95%) para o florfenicol.....	60
<b>Tabela 13.</b> Relação sinal/ruído para cada sulfonamida em ácido acético 0,5%.....	61
<b>Tabela 14.</b> Limites de detecção e quantificação do equipamento calculados para as	61

sulfonamidas em solução de ácido acético 0,5%.....	
<b>Tabela 15.</b> Relação sinal/ruído e limites de detecção e quantificação para o florfenicol em água.....	62
<b>Tabela 16.</b> Equações da reta e coeficientes de correlação para as sulfonamidas.....	63
<b>Tabela 17.</b> Equações da reta e coeficientes de correlação para o florfenicol.....	66
<b>Tabela 18.</b> Resultado dos testes estatísticos para avaliação de efeito de matriz para as sulfonamidas em camarão.....	71
<b>Tabela 19.</b> Recuperações das sulfonamidas em diferentes níveis de concentração.....	75
<b>Tabela 20.</b> Recuperações do florfenicol em diferentes níveis de concentração.....	76

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1 Sulfonamidas.....	19
3.2 Florfenicol.....	21
3.3 Aspectos de legislação.....	22
3.4 Métodos de análise de sulfonamidas em matrizes animais.....	24
3.5 Métodos de análise de florfenicol em matrizes animais.....	29
3.6 Cromatografia.....	31
3.7 Validação de Métodos Analíticos.....	35
3.7.1 Seletividade.....	37
3.7.2. Linearidade e faixa de aplicação.....	38
3.7.3. Precisão.....	39
3.7.4. Exatidão.....	39
3.7.5. Limite de detecção e limite de quantificação.....	40
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
4.1. Instrumentação.....	42
4.2. Reagentes, solventes e materiais.....	44
4.3. Padrões analíticos.....	44
4.4. Condições cromatográficas.....	46
4.5. Matriz.....	47
4.6. Procedimento de análise.....	48
4.6.1. Sulfonamidas em camarão.....	48
4.6.2. Florfenicol em camarão e tilápia.....	49
4.7. Validação dos métodos.....	49
4.7.1. Seletividade.....	50

4.7.2. Limite de detecção e de quantificação do equipamento (LDE e LQE).....	51
4.7.3. Linearidade.....	52
4.7.4. Faixa dinâmica.....	53
4.7.5. Efeito de matriz.....	53
4.7.6. Limite de detecção (LDM) e quantificação (LQM) do método.....	54
4.7.7. Recuperação.....	54
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
5.1. Condições cromatográficas.....	55
5.2. Seletividade.....	56
5.2.1 Sulfonamidas em camarão.....	56
5.2.2 Florfenicol em camarão e tilápia.....	59
5.3. Limites de detecção e quantificação do equipamento.....	61
5.3.1 Sulfonamidas em camarão.....	61
5.3.2 Florfenicol em camarão e tilápia.....	62
5.4. Linearidade.....	62
5.4.1. Linearidade sulfonamidas em camarão.....	63
5.4.2. Linearidade florfenicol em camarão e tilápia.....	66
5.5. Faixa dinâmica.....	68
5.6 Efeito de matriz.....	71
5.7 Limite de quantificação do método.....	74
5.8 Recuperação.....	74
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>83</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Dentro da aquicultura o cultivo de camarões é uma das mais promissoras áreas do agronegócio e a região Nordeste é produtora de mais de 90% de todo camarão cultivado no Brasil, que em sua maioria, é destinado ao mercado europeu. Apesar do crescimento acelerado até o ano de 2003, a carcinicultura brasileira enfrentou alguns desafios no ano de 2004, como a aplicação de taxas pelos países importadores e o surgimento de doenças infecciosas nos animais cultivados, fatos que acarretaram uma perda de 15,9% na produção (ABCC, 2008). Nesta atividade destaca-se ainda o cultivo de tilápia, espécie introduzida no Brasil a partir da década de 70, que cresceu em média 23% ao ano. A produção brasileira de 2005 ultrapassou a produção conjunta dos principais países exportadores da América Latina de filé fresco de tilápia para o mercado americano e no ano de 2008, devido à instabilização da economia, as exportações foram reduzidas a 13%, mesmo com um mercado interno fortalecido (AB-TILÁPIA, 2009).

Visando prevenir doenças, os produtores optam pela administração, muitas vezes indiscriminadas de antimicrobianos, sendo as sulfonamidas e os anfenicóis os grupos de drogas mais comumente utilizados. Estes antibióticos apresentam comprovada eficiência contra bactérias Gram-negativas e positivas, mas são relatados também possíveis efeitos carcinogênicos e resistência bacteriana causados por estes medicamentos.

Com a frequente utilização de medicamentos veterinários na aquicultura e com as crescentes exigências dos mercados consumidores quanto à segurança alimentar, foram estabelecidos programas e normas para fiscalizar os níveis de substâncias danosas à saúde humana têm sido estabelecidos. Associado a isso, a análise dos níveis de

resíduos das drogas citadas em alimentos e seu monitoramento requer a utilização de metodologias de qualidade, que ofereçam resultados confiáveis e reprodutíveis, sendo o processo de validação uma forma eficaz de assegurar que as metodologias definidas garantam resultados seguros para os consumidores.

O desenvolvimento e a validação de metodologias analíticas para determinação de resíduos de antibióticos em alimentos requer o domínio de importantes etapas que vão desde o conhecimento das características físico-químicas dos analitos, seleção das melhores condições cromatográficas, otimização dos processos de extração e *clean-up*, até a avaliação de conformidade de amostras comerciais.

O objetivo desta dissertação foi avaliar a aplicabilidade de metodologias analíticas baseadas em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos para determinação de antimicrobianos (sulfonamidas e florfenicol) em músculo de pescados (camarão e tilápia) comerciais produzidos na região Nordeste do Brasil.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Validar metodologias analíticas para determinação de antimicrobianos em peixe e camarão, utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) visando a segurança alimentar, o desenvolvimento econômico e a geração de um produto de qualidade comprometido com a sustentabilidade ambiental.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Validar um método multiresíduo para detecção e quantificação de sulfametazina (SMZ), sulfatiazol (STZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfaquinoxalina (SQ) em camarão cultivado utilizando CLAE-DAD;
- Validar um método para detecção e quantificação de florfenicol (FF) em peixe e camarão cultivado utilizando CLAE-DAD;
- Avaliar, a partir de análise cromatográfica, os níveis de antimicrobianos (sulfonamidas e florfenicol) em camarões e peixe comercializados no Estado de Pernambuco.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

Uma larga variedade de antimicrobianos está disponível para uso na medicina veterinária e aquicultura, entre esses, os antimicrobianos das classes dos betalactâmicos, sulfonamidas, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas e anfenicóis. Os antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos) são compostos que inibem o crescimento de determinados microrganismos, sendo utilizados na produção animal para (i) tratar enfermidades (terapêutico), (ii) prevenir contra enfermidades causadas pela presença de organismos patogênicos (profilático) e (iii) melhorar a taxa de crescimento ou conversão alimentar (promotores de crescimento) (MAMANI, 2007).

Estudos realizados em países como a Dinamarca, EUA, Itália e México (CHRISTENSEN et al., 2006; LALUMERA et al., 2004; DIETZE et al., 2005; LYLE-FRITCH et al., 2006) relataram que dentre os antibióticos e antimicrobianos mais comuns de uso na aquicultura, em todos os levantamentos realizados, encontram-se compostos da classe das tetraciclina, fluoroquinolonas, sulfonamidas e anfenicóis como o tianfenicol e o florfenicol (OLIVEIRA, 2008).

O uso de antibióticos em fazendas de camarão pode ser um risco potencial para os trabalhadores, para os animais e para o ambiente. Segundo Holmström et al (2003), o uso indiscriminado dessas substâncias pode ocasionar riscos, dentre os principais a seleção de bactérias resistentes, a alteração da microbiota dos cultivos e a transferência de resistência para bactérias patogênicas aos seres humanos (CARNEIRO, 2007). Essa resistência pode causar dificuldade no trato das infecções bacterianas nos cultivos e também em humanos que tenham sido expostos aos antibióticos. Os trabalhadores das fazendas normalmente misturam o antibiótico em pó na ração do camarão sem proteção

das mãos, o que expõe tanto a pele quanto o trato respiratório à droga. A manipulação incorreta de antibióticos pode gerar efeitos severos, como dermatites causadas por exposição às sulfonamidas (HOLMSTRÖM et al, 2003; GRÄSLUND et al, 2003, GEHRING et al, 2006).

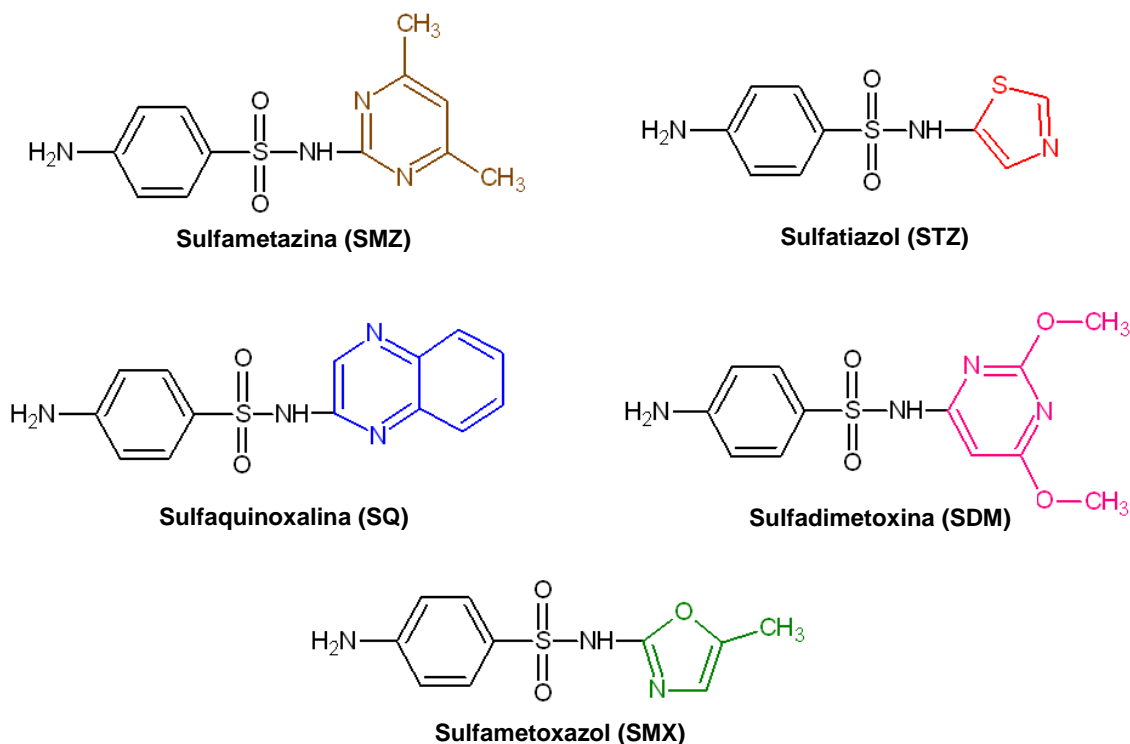
### 3.1. Sulfonamidas

As sulfonamidas (SAs) são um importante grupo de antimicrobianos sintéticos que têm sido usado efetivamente no combate às infecções bacterianas e também na prática veterinária para promover o crescimento animal.

O termo sulfonamida é utilizado para referir-se a derivados da para-amino-benzeno-sulfonamida (sulfanilamida). O grupo *p*-NH<sub>2</sub> é essencial e só pode ser substituído por radicais capazes de ser convertidos in vivo em grupo amino livre. As substituições feitas no grupo amida NH<sub>2</sub> possuem efeitos variáveis sobre a atividade antibacteriana da molécula. As sulfonamidas são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido para-aminobenzóico (PABA) e impedem a utilização dele pelas bactérias na síntese do ácido fólico ou vitamina B9. Mais especificamente, as sulfonamidas são inibidores competitivos da diidropteroato-sintetase, a enzima bacteriana responsável pela incorporação do PABA no ácido diidropteróico, precursor imediato do ácido fólico. Os microorganismos sensíveis são aqueles que precisam sintetizar seu próprio ácido fólico, as bactérias capazes de utilizar o folato pré-formado não são afetadas (GOODMAN, 1990).

A maioria dos membros dessa classe de compostos é relativamente insolúvel em água, mas os sais de sódio são rapidamente solúveis. As sulfonamidas (figura 1)

exercem ampla faixa de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GOODMAN, 1990).



**Figura 1.** Estruturas químicas das sulfonamidas (SAs)

Um estudo realizado em fazendas de camarão na Tailândia no ano de 2000 evidenciou que 74% dos produtores utilizaram antibióticos administrados na ração dos animais e dentre os grupos de compostos mais usados encontram-se as fluoroquinolonas, as tetraciclina e as sulfonamidas (GRÄSLUND, S. et al, 2003; HOLMSTROM, 2003). Recentemente a foi publicado pela *Food and Drug Administration* (FAO) uma compilação com os vinte e seis antimicrobianos mais potencialmente usados na aqüicultura mundial. Dos vinte e seis compostos examinados, a oxitetraciclina destaca-se como o antibiótico mais usado seguido do cloranfenicol e sulfonamidas como a sulfamerazina, sulfadimidina e sulfadimetoxina, que também são

listadas quando combinadas com o composto trimetropina (SAPKOTA, 2008). No Brasil, BARBIERI JR. e OSTRENSKY NETO (2001) relataram o uso das sulfonamidas na carcinicultura e também referenciaram seu uso em associação com a trimetropina.

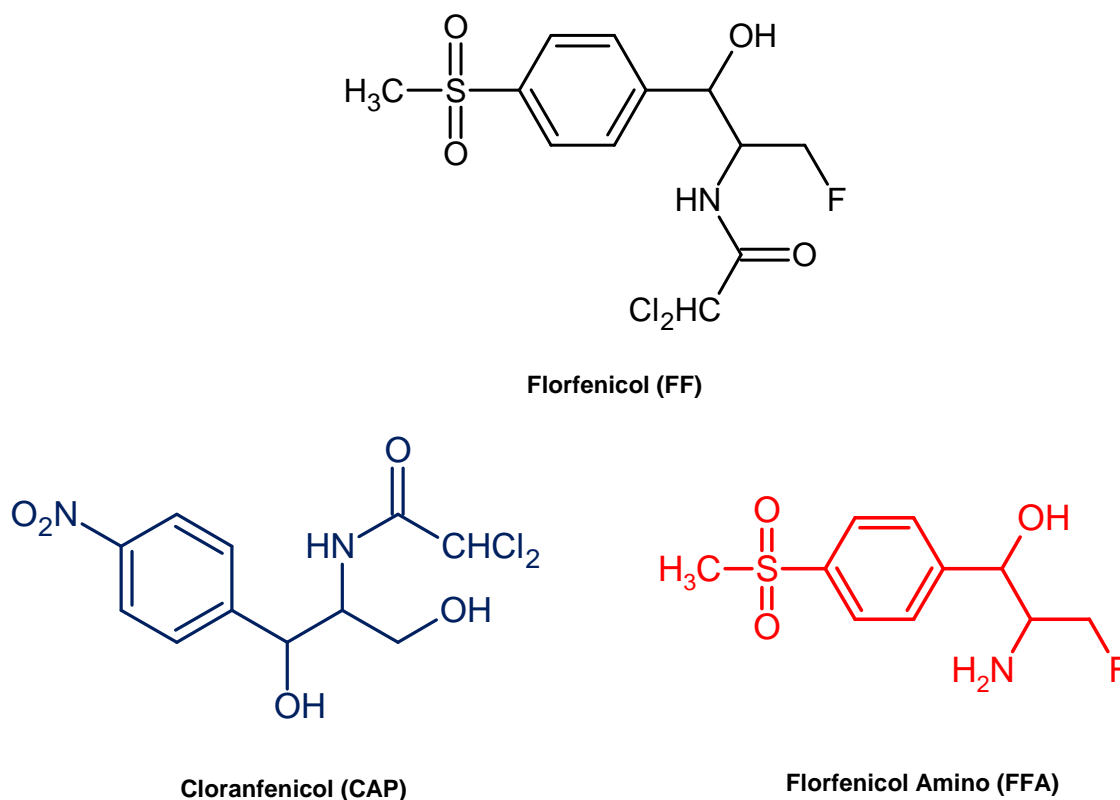
A presença de resíduos de sulfonamidas em alimentos de origem animal também tem requerido especial atenção por causa do potencial risco à saúde humana. Diversos estudos têm reportado os possíveis efeitos carcinogênicos das sulfonamidas (CAI, et al, 2008; SHAO et al, 2005; DOST et al, 2000; LITTLEFIELD, et al, 1990; ROYBAL, 2003; KISHIDA & FURUSAWA, 2003) e uma pesquisa demonstrou a presença de tumores em roedores ocasionados pelo uso da sulfametazina (DOST et al, 2000).

### **3.2. Florfenicol**

O antibiótico florfenicol, composto fluorinado derivado do tianfenicol, pertence à classe dos anfenicóis. O florfenicol apresenta-se como um análogo do cloranfenicol onde o grupo nitro do anel aromático deste é substituído por um grupo sulfonilmetil (figura 2). Diversos estudos comprovam sua atividade bacteriostática contra organismos Gram-positivos e Gram-negativos (FENG et al, 2008; PENG, et al, 2006; PEZZA, et al, 2006; WRZESINSKI, et al, 2006; HAYES, 2005; HORMAZABAL et al, 1993). O mecanismo de ação deste antibiótico é baseado na habilidade de inibir a síntese protéica dos organismos patógenos ligando-se à subunidade ribossomal 50S (MOORE, 2007).

Estudos metabólicos utilizando a espécie salmão do Atlântico identificaram que o metabólito FFA encontra-se presente em maior quantidade em músculo enquanto que o florfenicol também se distribui na pele dos peixes (WRZESINSKI, et al, 2006; EMEA, 1997).

Recentemente, a disseminação do florfenicol tem crescido rapidamente por sua eficácia e pelo fato de que, mesmo tendo estruturas semelhantes ao cloranfenicol, não existem estudos que associem seu uso ao aparecimento de anemia aplástica (PEZZA, 2006). Apesar disto existe a necessidade de se estabelecerem métodos sensíveis para determinação de florfenicol devido ao risco potencial de resistência bacteriana causada por seu uso indiscriminado.



**Figura 2.** Estruturas químicas dos anfenicolis

### 3.3. Aspectos de Legislação

O uso indiscriminado de drogas veterinárias, sobretudo de antimicrobianos, em alimentos de origem animal, demandou do comércio internacional uma maior exigência



quanto à segurança alimentar, o que ocasionou em um maior controle dos produtos por parte dos mercados. Limites Máximos de Resíduos (LMR) foram estabelecidos para proteger a saúde dos consumidores dos efeitos toxicológicos causados pela presença de resíduos de antibióticos em alimentos e atender às exigências dos mercados.

Em 2006, o *Codex Alimentarius* emitiu um documento que estabelece o LMR de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  para o somatório das sulfonamidas em músculo de pescado (CODEX ALIMENTARIUS, 2006).

A *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA), agência para a avaliação de produtos medicinais responsável pelos regulamentos da União Européia, através do Regulamento CEE N° 2377/90 estabelece para o somatório de SAs um LMR de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  (EMA, 1990). Nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* (FDA) estabelece um LMR de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  para a sulfadimetoxina em salmonídeos e catfish.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu, no ano de 2000, um limite máximo de resíduo de sulfametazina em  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Em junho de 2006, para atender aos requisitos da União Européia em caráter emergencial foi criado o Programa de Controle de Resíduo em Pescado (PCRP) integrando o Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) onde foram incluídos LMR para outras sulfonamidas (BRASIL, 2006). Em abril de 2008, o Ministério da Agricultura publicou a Instrução Normativa n° 10 atualizando os LMR e limites de quantificação para o grupo das sulfonamidas conforme descrito na tabela 1.

**Tabela 1.** Antimicrobianos e seus LMR estabelecidos.

<i>Substância</i>	<i>LMR*(<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</i>	<i>Matriz</i>
Sulfametazina		
Sulfadimetoxina	100	Músculo camarão
Sulfatiazol		
Sulfamerazina		
Florfenicol	1000	Músculo e pele de pescado em proporções normais

\* EMEA, 1990; FDA, 2007; CODEX, 2006

O florfenicol é o primeiro antibiótico desenvolvido e registrado especialmente para o tratamento de doenças bacterianas em criações comerciais de peixes e já se apresenta como o segundo antibiótico mais utilizado na Noruega e em países como o Chile e o Canadá (MOORE, 2007). É comercializado a uma concentração de 50% conhecida como Aquaflor<sup>®</sup>. A EMEA, também através do Regulamento CEE N<sup>o</sup> 2377/90 estabelece limites máximos de resíduos de florfenicol em pescado, especificamente nos tecidos de músculo e pele, e a FDA aprova o uso dessa droga para fins veterinários, mas estabelece um LMR de 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (FDA, 2007).

### 3.4. Métodos de análise de sulfonamidas em matrizes animais

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para detecção de sulfonamidas em produtos de origem animal e são constituídos pelas etapas de extração em fase líquida com um solvente apropriado, limpeza em fase sólida e determinação por uma técnica

analítica específica. As sulfonamidas não apresentam boa solubilidade em solventes apolares, mas têm boa solubilidade em solventes polares como acetonitrila, acetato de etila e diclorometano (WANG, 2006). Algumas matrizes necessitam da adição de solventes que promovam a desnaturação de proteínas presentes (BARBIERI et al, 1995) e muitos estudos indicam a necessidade da etapa de *clean up* devido à natureza complexa das matrizes de origem animal.

A determinação de resíduos de antimicrobianos como as sulfonamidas envolve a quantificação de concentrações na ordem de  $\mu\text{g kg}^{-1}$  o que dificulta os procedimentos analíticos, principalmente em amostras complexas como alimentos, fazendo com que a utilização de técnicas cromatográficas seja, na maioria dos casos, imprescindível (MAMANI, 2007). Considerando as propriedades físico-químicas dos antimicrobianos, são empregadas diversas técnicas como a cromatografia em camada delgada (TLC, do inglês *Thin Layer Chromatography*), a eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*), o ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA, do inglês *Enzyme-linked Immunosorbant Assay*), uso de biosensores (BIA, do inglês *Biosensor Immunoassay*), além da cromatografia gasosa.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica mais empregada para determinação de sulfonamidas, principalmente quando associada à absorção por ultravioleta (UV) (BERZAS-NEVADO et al. 2001; CABALLERO et al. 2001; PECORELLI et al. 2004), fluorescência (FLD) (ANNE-CLAIRE & ZEGGANE 2003; MAUDENS et al. 2004; SALISBURY et al. 2004), detecção por arranjo de diodos (DAD) (KISHIDA & FURUSAWA 2003; GARCIA et al. 2004; KISHIDA et al. 2004) e à espectrometria de massas (MS) como técnica confirmatória (BOGIALLI et al. 2003; KIM et al. 2003; MSAGATI & NINDI 2004). Nas tabelas 2a e 2b estão

resumidos métodos cromatográficos reportados na literatura para a determinação de sulfonamidas em produtos de origem animal.

**Tabela 2a.** Métodos por CLAE utilizados para determinação de sulfonamidas em produtos animais.

<i>Análito</i>	<i>Preparo amostra</i>	<i>Coluna</i>	<i>Fase móvel</i>	<i>Recuperação</i>	<i>LQ</i>	<i>Referência</i>
SG, SA, SAA, SIM, SD, STZ, SP, SM, SMO, SMZ, SME, SMT, SMP, SCP, SMX, SMM, SDM, SSA, SB, SDO, SQX, SNT, SNZ	1g de amostra homogeneizada com 10 mL acetonitrila, centrifugação a 15000 r min <sup>-1</sup> , adição de 10mL de água e 10mL de acetato de etila. Evaporação fase orgânica, filtração membrana 0,22µm	C18 (100mm×2.1mm, Waters)	Ácido fórmico 0.2% em água e ácido fórmico 0.2%, em metanol	67.8–113.9%	0.2–50 µg kg <sup>-1</sup>	CAI, et al. (2008)
SDA, SDD, SMM, SMX, SDM, SQ	Dispersão em matriz de fase sólida com uma solução de etanol 70% (v/v), evaporação e ressuspensão em 1mL da fase móvel	RP-8 (250x4,0 mm)	Ácido acético 0,3% (v/v) e etanol (83:17)	< 90%	0,006 – 0,04 ppm	KISHIDA (2007)
SDA, SDD, SMM, SMX, SDM, and SQ	Dispersão em matriz de fase sólida com uma solução de etanol 70% (v/v), evaporação.	LiChrospher RP-8	Ácido acético 1% e acetonitrila-água-DMF (78:22:5)	< 87.6%	0,006 – 0,04 ppm	KISHIDA & FURUSAWA (2001)
SDZ, STZ, SMZ, SMP, SMX, SDM	Adicionar 2.0mL de TCA 20% e 20.0 mL de tampão McIlvain, seguido de ajuste de pH, centrifugação e SPE (HLB SPE 6 mL, 500 mg)	SymmetryShield RP18 3.5 _m, 150 mm×2.1 mm	1mM ácido oxálico em acetonitrila 5% em água e ácido oxálico 1mM	72.01 - 97.39%	0,75 - 0,7 ng/mL	KOESUKWIWAT et al. (2007)
SDA, SMR, SMZ, SMD, SMX, SDM	Adicionar 5ml de acetonitrila a 5g de amostra e homogeneizar por 10 min. Transferir uma alíquota de 1ml para uma microcentrífuga contendo sorbente C18, o resíduo foi dissolvido em ácido acético	Luna RP-18 (150mm×4.6 mm)	Metanol e ácido acético a 2%	< 90%	1–5 µg/kg	POSYNIAK et AL. (2005)

**Tabela 2b.** Métodos por CLAE utilizados para determinação de sulfonamidas em produtos animais.

<i>Analito</i>	<i>Preparo amostra</i>	<i>Coluna</i>	<i>Fase móvel</i>	<i>Recuperação</i>	<i>LQ</i>	<i>Referência</i>
SDZ, STZ, SP, SMR, SMZ, SCP, SMMX, SMX, SQ, SDMX	Extração com acetato de etila, centrifugação, ressuspensão do resíduo em acetato de etila e purificação usando coluna Speedisk	C8 (250mm×3mm)	Acetonitrila e tampão acetato pH 4,5	72 – 92%	30 – 70ng mL <sup>-1</sup>	PECORELLI et al. (2004)
SCP, SDZ, SMZ, SA, SMPZ, SQ, STZ, SDD, SP, SDM, SDX, SG	Extração com acetonitrila seguida de filtração em sulfato de sódio anidro, evaporação e SPE (Cartuchos do tipo SCX)	C-18 (150x3,0 mm)	Ácido acético 0,5% (v/v) e acetonitrila	53- 104%	Não informado	STUBBINGS et al. (2005)
SMZ	Extração com acetonitrila seguida de <i>clean up</i> com SPE	ODS-2	Acetonitrila-água 0,1 mol L <sup>-1</sup> e acetato de amônia	Não informada	8,2 ng mL <sup>-1</sup>	KIM et al (2003)
SDZ, SDD, SMMX, SMX, SQ, SDMX	Amostras extraídas por dispersão de matriz em fase sólida com uma solução de etanol	Mightysil RP-4	Ácido acético 2% etanol (75:25)	> 85%	6-40 ng mL <sup>-1</sup>	KISHIDA & FURUSAWA (2003)
SDZ, SMR, SDD, SIZ, SMPD, SMMX, SMX, SIX, SDMX, SQ	Extração com acetato de etila seguida de evaporação e <i>clean up</i> SPE cartucho tipo PAS	(C18 250mm x 4,6 mm)	Metanol-acetonitrila-ácido fórmico	70,8 – 98,2%	30 µg kg <sup>-1</sup>	ITO et al. (2000)

### 3.5. Métodos de análise de florfenicol em matrizes animais

Existem diversos estudos na literatura que propõem métodos para determinação de florfenicol em pescado. Vale destacar que há uma tendência multiresíduo nas metodologias pesquisadas, não só por causa da similaridade entre as moléculas do grupo anfenicóis, mas também pela praticidade e rapidez deste tipo de método visando a redução de custos. Outra vantagem evidente é o fato do LMR para o florfenicol ser relativamente alto ( $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) quando comparado com o limite de outros compostos, o que acarreta em uma extração menos “preocupada” com desenvolvimento de métodos extremamente sensíveis.

Para a determinação de FF em matrizes de origem animal animais são encontrados estudos que utilizaram a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (PENG, 2006; ZHANG, 2005), cromatografia eletrocínica micelar (PEZZA, 2006) e mais recentemente por ensaio com enzimas imuno-adsorvidas - ELISA (WU, 2008).

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV apresenta-se na literatura como a técnica mais utilizada para detecção de FF (FENG, 2008; WRZESINSKI, 2006; HAYES, 2005; WRZESINSKI, 2003; VUE, 2002; HORMAZABAL, 1993), confirmando o exposto acima. A tabela 6 resume os métodos por CLAE pesquisados para determinação de FF e as devidas condições de análise. A tabela abaixo resume os métodos por CLAE pesquisados para determinação de FF e as devidas condições de análise.

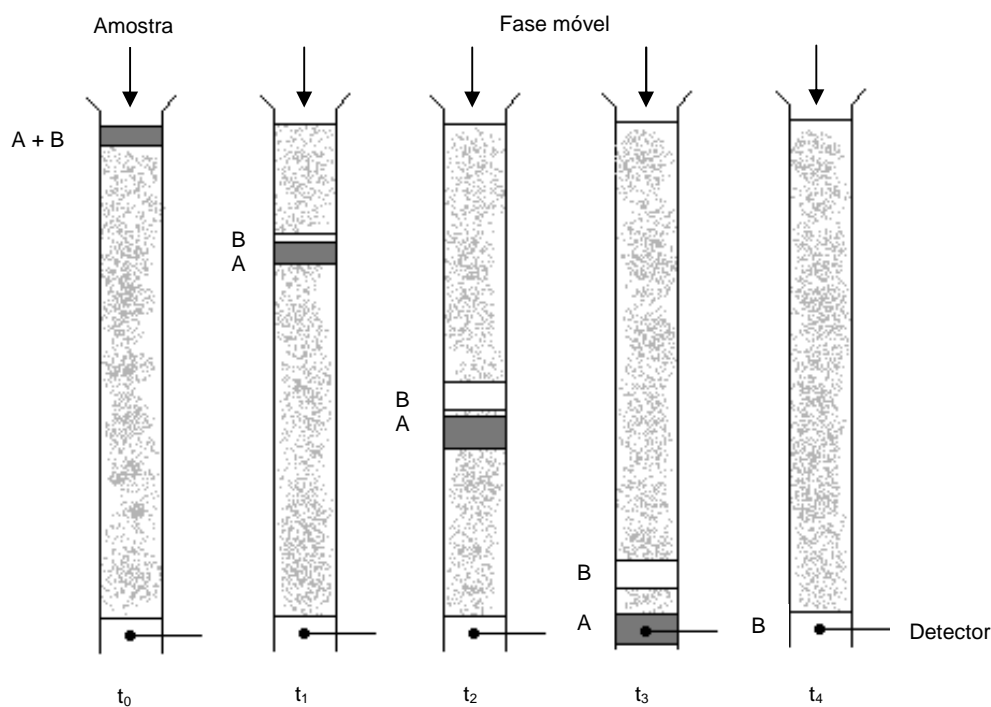
**Tabela 3.** Métodos para determinação de florfenicol em produtos animais.

<i>Analito</i>	<i>Preparo amostra</i>	<i>Coluna</i>	<i>Fase móvel</i>	<i>Recuperação</i>	<i>LQ</i>	<i>Referência</i>
FF	Extração com uma solução acetonitrila-água (50:50, v/v) seguida de centrifugação e extração em fase sólida com cartucho Envi-Carb	C18 (150mm×4,6mm)	Acetonitrila-água	100,5%	1 mg kg <sup>-1</sup>	HAYES (2005)
FF	Extração com acetonitrila-água (1:1), seguida de homogeneização com sonificador e clean up com cartuchos Envi-Carb	C18 (250mm×4,6mm)	Acetato de sódio 0,01 mol L <sup>-1</sup> e acetonitrila (2:1)	Não informado	Não informado	WRZESINSKI (2006)
FF e FFA	Extração com acetona e diclorometano seguida de evaporação e adição de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	C18 (200mm×4,6mm)	Tampão sulfonato	99-107% (FF) 94-100% (FFA)	50 ng g <sup>-1</sup>	HORMAZABAL (1993)
FF	Extração com acetato de etila seguida de desengorduração com hexano e centrifugação	C18 (250mm×4,6mm)	Acetonitrila-água (25:75)	89,16 – 96,13%	0,03 µg g <sup>-1</sup>	FENG (2008)
FFA	Extração com acetato de etila, seguida de hidrólise ácida e clean up.	C18 (250mm×4,6mm)	-	85.7 - 92.3%	0.044 µg g <sup>-1</sup>	WRZESINSKI (2003)
FF e FFA	Extração com hexano seguida de <i>clean up</i> com cartuchos Oasis MCX	C18 (250mm×4,6mm)	-	81.7-109.7% (peixe) 94.1-103.4% (camarão) 71.5 - 91.4% (porco)	0.5 ng g <sup>-1</sup> (FF) 1 ng g <sup>-1</sup> (FFA)	ZHANG, 2005



### 3.6. Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico empregado de forma ampla e que permite a separação, identificação e determinação de componentes em misturas complexas. Apesar do termo cromatografia ser difícil de definir, visto que tem sido aplicado a diversos sistemas, o princípio da técnica baseia-se no uso de uma fase estacionária (FE) e de uma fase móvel (FM). Os componentes da mistura são transportados através da fase estacionária pelo fluxo da fase móvel e as separações ocorrem baseadas nas diferenças de velocidade de migração (figura 3).



**Figura 3.** Diagrama descrevendo a separação por eluição em coluna (SKOOG, 2007)

Os métodos cromatográficos podem ser classificados de acordo com o interesse e baseados em diferentes fatores como fase móvel, fase estacionária, tipo de detecção, etc. Na tabela 4, adaptada de Skoog (2007) e Vogel (2002), os métodos cromatográficos estão

divididos em categorias baseadas na natureza da fase móvel: líquida, gasosa e fluido supercrítico.

**Tabela 4.** Classificação dos métodos cromatográficos em coluna.

<i>Classificação geral</i>	<i>Método</i>	<i>Fase estacionária</i>	<i>Tipo de equilíbrio</i>
Cromatografia gasosa (CG)	Gás-líquido (CGL)	Líquido adsorvido ou ligado à superfície de um sólido	Partição entre o gás e o líquido
	Gás-sólido	Sólido	Adsorção
Cromatografia líquida	Líquido-líquido partição	ou Líquido adsorvido ou ligado à superfície de um sólido	Partição entre líquidos imiscíveis
	Líquido-sólido adsorção	ou Sólido	Adsorção
	Troca iônica	Resina trocadora de íons	Troca iônica
	Exclusão por tamanho	Líquido nos interstícios de um sólido polimérico	Partição / penetração
	Afinidade	Líquido específico para determinado grupo ligado a uma superfície sólida	Partição entre líquido superficial e o líquido móvel
Cromatografia supercrítica (CS) (fase móvel é um fluido supercrítico)		Espécies orgânicas ligadas a uma superfície sólida	Partição entre o fluido supercrítico e a fase ligada

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica que em menos de trinta anos passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins quantitativos e qualitativos devido à sua versatilidade e amplo emprego. A CLAE é utilizada para separar materiais orgânicos, inorgânicos, biológicos, amostras ambientais, farmacológicas e de alimentos (SKOOG, 2007; SNYDER, 2005; VOGEL, 2002).

A CLAE utiliza o princípio de um sistema de separação automatizado sob alta pressão, que originalmente levou à denominação de Cromatografia Líquida de Alta Pressão. Com o avanço dos estudos, verificou-se que o princípio da técnica não estaria fundamentada nas pressões, e sim no processo de separação, constatação que foi possível através do desenvolvimento de partículas cada vez menores e colunas mais modernas (SNYDER, 2005).

Em CLAE, as escolhas e as possibilidades de variação da fase móvel são fatores críticos para a eficiência do método, pois uma fase móvel adequada é vital para a cromatografia líquida. O poder de eluição da fase móvel é determinado por sua polaridade, pela polaridade da fase estacionária e pela natureza dos componentes da amostra. Para separações com fase normal, o poder de eluição aumenta com o aumento da polaridade do solvente e nas separações com fase reversa o poder de eluição diminui com o aumento da polaridade do solvente. Na CLAE com coluna de fase reversa o mecanismo de retenção dos analitos é proporcionado pelo particionamento da porção lipofílica da molécula dentro da fase estacionária, levando a um maior tempo de retenção do analito (SKOOG, 2007; SNYDER, 2005; BEDOR, 2004; VOGEL, 2002).

Com relação à fase móvel, outras propriedades que devem ser observadas são: o ponto de ebulição, a viscosidade, a compatibilidade com o detector, a inflamabilidade e a toxicidade. (VOGEL, 2002).

Outro componente essencial em CLAE é a escolha do detector, que mede as mudanças de concentração do sistema através de alguma propriedade físico-química (absorção no ultravioleta, potencial de óxido-redução, índice de refração, fluorescência, etc.) ou da massa que está deixando a coluna no sistema cromatográfico. A escolha de um detector requer um sistema com alta sensibilidade, alta seletividade, boa resposta a um grande número de compostos e habilidade na detecção de misturas complexas (SKOOG, 2007; SNYDER, 2005;

BEDOR, 2004; VOGEL, 2002). A tabela 5 lista diferentes tipos de sistemas de detecção e seus limites de detecção aproximados. Faz-se necessário destacar a sensibilidade e seletividade do sistema com absorvância no UV-visível que é reportado como o mais utilizado dos detectores disponíveis no mercado.

**Tabela 5.** Detectores usados na cromatografia líquida de alta eficiência

<i>Nome</i>	<i>Limite de detecção aproximado (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</i>	<i>Gradiente</i>	<i>Aplicação</i>
UV-visível	$10^{-4}$	S	Seletivo, versátil
Fluorescência	$10^{-5}$	S	Seletivo, número limitado de compostos
Infravermelho por transformada de Fourier	1	S	Seletivo, versátil
Espectrometria de massas	$10^{-5}$	S	Detector universal
ICP-MS	$2,5 \cdot 10^{-3}$	S	Espécies metálicas

Hoje a CLAE consolida-se como uma técnica analítica indispensável e de alto poder de resolução, o que possibilita separações rápidas, monitoramento contínuo do eluente, medidas quantitativas acuradas, análises reprodutíveis e repetitivas com a mesma coluna e automação do procedimento analítico e do manuseio dos dados justificando assim o amplo uso da técnica atualmente.

### 3.7. Validação de métodos analíticos

Uma informação ou resultado analítico originado de uma medição química, ao ser considerado um recurso, tem certas características, dentre as quais a exatidão. Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis, exatas e interpretáveis sobre a amostra ele deve se submeter a um processo chamado de validação (RIBANI, 2004).

A validação de um método analítico é o processo de demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido. A validação é um aspecto da garantia da qualidade analítica e tem recebido considerável atenção na literatura (BARROS, 2002).

A validação de um método é um processo contínuo, que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo seu desenvolvimento e implantação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado. A documentação da validação deve conter: a especificação dos requisitos, as características de desempenho obtidas, os critérios de aceitação dos valores obtidos das características de desempenho em comparação com os requisitos e a afirmação da validade dos resultados quanto ao atendimento ao uso pretendido (INMETRO, 2007).

Sendo assim, existem razões que justificam a implantação de métodos validados, mesmo não havendo uma norma estabelecida nacional ou internacionalmente. No Brasil, os laboratórios que querem comprovar sua competência técnica devem se submeter a processos de acreditação que são executados pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Hoje, instituições como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) exigem a acreditação pelo INMETRO como pré-requisito em seus processos de credenciamento. O documento INMETRO-DOQ-CGCRE-008 (2007) consolidou-se como guia brasileiro para validação de métodos analíticos, porém muitos outros guias podem ser

tomados como referência para o planejamento da validação. A tabela 6, adaptada de Ribani (2004) compara os parâmetros de validação estabelecidos por órgãos brasileiros e internacionais (*International Conference on Harmonization, International Union of Pure and Applied Chemistry e United States Pharmacopeia*).

**Tabela 6.** Comparação entre parâmetros de validação dos principais órgãos regulamentadores

<i>INMETRO</i>	<i>ANVISA, USP, ICH</i>	<i>IUPAC E mapa</i>
Especificidade / seletividade	Especificidade / seletividade	Seletividade
Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho	Intervalo	Intervalo
Linearidade	Linearidade	Linearidade
Limite de detecção	Limite de detecção	Limite de detecção
Limite de quantificação	Limite de quantificação	Limite de determinação ou quantificação
Sensibilidade	-	Sensibilidade
Exatidão e tendência	Exatidão	Exatidão e tendência
Precisão	Precisão	Precisão
Repetitividade	Precisão repetibilidade	Repetitividade
Precisão intermediária	Precisão intermediária	Precisão intermediária
Reprodutibilidade		Reprodutibilidade
Robustez	Robustez	Robustez

Apesar de a validação ser um requisito fundamental para a acreditação, os guias não tem poder de lei e não estabelecem como ela deve ser executada. As características de desempenho do método (parâmetros de validação) foram estabelecidas de acordo com recomendações do documento do INMETRO: Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos (2007), sendo eles: Seletividade, limite de detecção do equipamento (LDE), limite de quantificação do equipamento (LQE), linearidade, efeito de matriz, limite de

detecção do método (LDM), limite de quantificação do método (LQM), exatidão (recuperação), repetitividade (precisão), reprodutibilidade (precisão intermediária).

### **3.7.1. Seletividade**

A seletividade de um método é a capacidade de avaliar e determinar de forma inequívoca o analito em questão na presença de componentes que possam interferir com a sua determinação numa amostra complexa. Em amostras de origem animal, a seletividade é um parâmetro importante devido ao grau de interferência de espécies similares que existem e que podem atrapalhar a detecção dos compostos de interesse, nesse caso devem ser estudados a matriz com ou sem o analito, matérias-primas do processo, impurezas dos materiais envolvidos no processo, subprodutos e produtos de degradação e reagentes em branco (LANÇAS, 2004; RIBANI, 2004).

É fundamental estabelecer a diferença entre especificidade e seletividade que são muito usados como termos equivalentes por alguns autores. Um método que produz resposta para um único analito é chamado de específico e um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum, pode ser chamado de seletivo. Ribani (2004) recomenda que a seletividade deve ser o primeiro parâmetro de validação a ser definido e que ela deve ser reavaliada durante a validação e uso do método.

A seletividade pode ser obtida comparando a matriz isenta da substância de interesse com a matriz adicionada com essa substância (padrão) ou realizando a análise por outra técnica cromatográfica como espectrometria de massas. No primeiro caso nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse além desta apresentar-se bem separada dos demais componentes da amostra. Quando não é possível encontrar matriz sem a

presença do analito, pode-se utilizar o método da adição padrão, construindo uma curva analítica com adição da substância de interesse e comparando com uma curva sem a presença da matriz, caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação (LANÇAS, 2004; RIBANI, 2004; LEITE, 2002).

### **3.7.2. Linearidade e faixa de aplicação**

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI, 2004). A linearidade é determinada por meio de uma relação matemática e de gráficos de calibração, seguidos de um tratamento estatístico. Essas relações podem ser expressas como uma equação de reta chamada de curva analítica, definidas por, no mínimo, cinco pontos que não incluam o zero da curva.

Matematicamente, os coeficientes de uma curva analítica podem ser estimados utilizando o método matemático das regressões lineares, onde é possível também calcular o coeficiente de correlação  $r$ . Este coeficiente permite uma estimativa da linearidade da curva obtida, pois um valor de  $r$  muito próximo de 1,0 evidencia uma menor dispersão do conjunto de pontos experimentais. O INMETRO (2007) recomenda um coeficiente de correlação acima de 0,90, mas também sugere um tratamento estatístico dos dados da curva através do  $t$  (Student) com 95% de confiança.

### **3.7.3. Precisão**

A precisão é a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra e pode ser determinada em condições de repetibilidade ou em



condições de reprodutibilidade. Para as condições de repetibilidade são utilizados o mesmo método, a mesma amostra, o mesmo laboratório, o mesmo operador e o mesmo equipamento. Para as condições de reprodutibilidade os resultados são obtidos quando são usados o mesmo método, a mesma amostra, diferentes laboratórios, diferentes operadores, diferentes equipamentos (LANÇAS, 2004).

A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto ( $\sigma$ ) que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto ( $s$ ). Para a repetitividade, o INMETRO (2007) recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão (LANÇAS, 2004; RIBANI, 2004; LEITE, 2002).

#### **3.7.4. Exatidão**

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados encontrados pelo ensaio e aqueles definidos por um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão é sempre considerada dentro de limites estabelecidos a um determinado nível de confiança e podem ser flexibilizados tanto para níveis de concentração elevados como para análises em níveis de traços. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são materiais de referência, comparação de métodos, adição padrão e ensaios de recuperação.

A recuperação, que se define como a porção do analito, presente ou adicionado, que é passível de ser quantificada, é o parâmetro mais comumente utilizado nos estudos de exatidão. Uma limitação que merece destaque nos testes de recuperação é que a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra, o que pode acarretar

numa facilidade de detecção do analito e conseqüentemente valores mais altos de recuperação (LANÇAS, 2004; RIBANI, 2004; LEITE, 2002).

### **3.7.5. Limite de detecção e limite de quantificação**

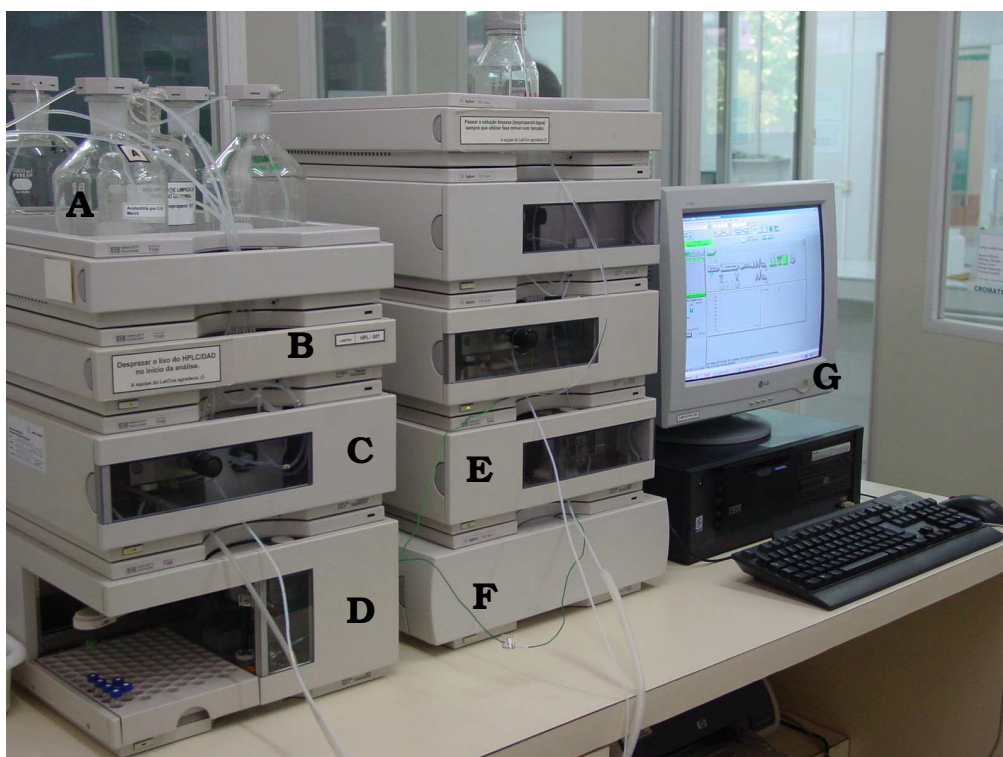
O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, e é normalmente definido como a menor concentração da substância de interesse que pode ser diferenciada do ruído do sistema com segurança. Utiliza-se a relação sinal-ruído quando os procedimentos analíticos adotados apresentem linha de base, e a exigência para se distinguir ruído entre um sinal analítico varia bastante. Aceita-se geralmente como LD a concentração que gera um sinal três vezes maior que o ruído do sistema ou que produza um sinal igual a  $3s$ , em que  $s$  é o desvio padrão do ruído medido empregando-se o branco. É possível ainda determinar o LD pelo método visual e pelo método utilizado em parâmetros da curva analítica (LANÇAS, 2004).

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada. A determinação do LQ exige como requisito um compromisso entre a concentração, a precisão e a exatidão exigidas, isto é, quando a concentração do LQ decresce, a medição se torna menos precisa e se houver uma necessidade de maior precisão, deve ser registrada uma concentração maior para o LQ (RIBANI, 2004). Vale observar também que tanto o LD e o LQ são influenciados diretamente pelas condições cromatográficas, devendo então ser asseguradas, através da conformidade do sistema, as melhores condições cromatográficas possíveis e também qualidade e tempo de uso da coluna cromatográfica (LANÇAS, 2004; RIBANI, 2004; LEITE, 2002).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Instrumentação

As análises foram realizadas utilizando um Cromatógrafo líquido Agilent HP 1100 (figura 4) equipado com uma bomba de alta pressão quaternária (G1311A) e uma bomba isocrática (G1310A), desgaseificador (G1322A), injetor automático (G1313A), forno com temperatura controlada (G1316A), detector DAD (G1315A) e software Chemstation 2002 para aquisição e processamento dos dados.



**Figura 4.** Componentes de um sistema cromatográfico: (A) Fase móvel; (B) Desgaseificador; (C) Bomba; (D) Injetor automático; (E) detector; (F) Forno contendo coluna cromatográfica; (G) Computador para aquisição e processamento de dados. Fonte: Instituto de tecnologia de Pernambuco.

Também foi utilizado um Cromatógrafo SHIMADZU (figura 5) composto de bomba de alta pressão (Shimadzu – LC 10ATvp), auto injetor (Shimadzu SIL-10AF), forno (Shimadzu CTO-10A VP), detector de arranjo de diodos (UV) (Shimadzu SPD-M10A VP),

sistema controlador (Shimadzu SCL-10AVP) para conexão dos módulos com computador e software Shimadzu Class VP 6.14 SP2 para a aquisição e processamento dos dados.



**Figura 5.** Componentes de um sistema cromatográfico: (A) Fase móvel; (B) Sistema Controlador; (C) Desgaseificador; (D) Bomba; (E) Injetor automático; (F) detector; (G) Forno contendo coluna cromatográfica; (H) Computador para aquisição e processamento de dados. Fonte: Instituto de tecnologia de Pernambuco.

A homogeneização da amostra foi feita em um Liquidificador industrial de alta rotação METVISA. Para a pesagem da amostra foi utilizada uma Balança analítica Ohaus adventurer calibrada com resolução de 0,0001g e uma Balança analítica Mettler Toledo AG balance calibrada com resolução de 0,0001 g e 0,00001 g foi empregada na pesagem dos padrões analíticos. Durante o processo de extração foram utilizados um Vórtex Phoenix AP 56 e uma Mesa agitadora IKA KS 130 Basic para homogeneização dos tecidos animais. Foram utilizadas também centrífugas Jouan B4i e Sorvall para a searação dos extratos. Um Evaporador rotativo Büchi R-200 com controle de pressão e temperatura foi utilizado para a

secagem do solvente de extração e a extração em fase sólida foi executada com o auxílio de um Manifold Phenomenex com capacidade para processamento de múltiplos cartuchos.

#### 4.2. Reagentes, solventes e materiais

Foram utilizados acetronitrila grau CLAE (J.T. Baker, Phillipsburg, Nova Jersey, EUA), acetato de etila grau CLAE (J.T. Baker, Phillipsburg, Nova Jersey, EUA), acetona grau CLAE (Mallinckrodt Chemicals, Phillipsburg, EUA), ácido acético glacial (J.T. Baker, Cidade do México, México), água ultrapura obtida através de sistema Milli-Q® (Millipore, EUA), amoníaco 25% grau ACS (Merck, Darmstadt, Alemanha), metanol grau CLAE (J.T. Baker, Phillipsburg, Nova Jersey, EUA), n-hexano grau ACS (J.T. Baker, Cidade do México, México) e sulfato de sódio anidro grau P.A. (F. Maia, São Paulo, Brasil). Os cartuchos utilizados para extração em fase sólida foram do tipo Strata SCX (sorbente ácido benzenossulfônico) 500mg, 3mL adquiridos da Phenomenex, EUA e as membranas para filtração de 0,45µm foram fornecidas pela Millipore, EUA.

#### 4.3. Padrões analíticos

Foram utilizados como materiais de referência (padrões analíticos) os antimicrobianos listados na tabela abaixo:

**Tabela 7.** Padrões analíticos utilizados e especificações.

Sustância	Fornecedor	Pureza (%)
Sulfatiazol (STZ)	United States Pharmacopeial	100
Sulfametazina (SMZ)	United States Pharmacopeial	100
Sulfadimetoxina (SDM)	United States Pharmacopeial	100
Sulfaquinoxalina (SQ)	United States Pharmacopeial	100
Sulfametoxazol (SMX)	Farmacopéia brasileira	99,7

Florfenicol (FF)

Schering-Plough

99

---

Os frascos contendo os padrões analíticos foram armazenados em dessecador à temperatura ambiente sob proteção de luz. A substância sulfametoxazol foi utilizada como padrão interno na metodologia para determinação de sulfonamidas em camarão.

As soluções estoque das sulfonamidas foram preparadas individualmente a partir dos padrões analíticos dissolvidos em metanol grau CLAE, em uma concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , e armazenadas em freezer (-18 a  $-22^{\circ}\text{C}$ ). Antes da pesagem, as sulfonamidas, exceto a sulfadimetoxina, foram submetidas à secagem em estufa regulada a  $105^{\circ}\text{C}$  segundo as recomendações da *United States Pharmacopeial - USP* e da Farmacopéia Brasileira. As soluções intermediárias consistiam em um mix de todas as sulfonamidas e foram preparadas a partir de cada solução estoque e diluídas em solução de ácido acético 0,5%. As soluções de trabalho foram preparadas a partir de diluições das soluções intermediárias também em ácido acético 0,5%.

Para o florfenicol foi preparada uma solução estoque na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  dissolvida em metanol grau CLAE e armazenada em freezer (-18 a  $-22^{\circ}\text{C}$ ). As soluções intermediárias e de trabalho foram preparadas a partir da solução estoque e diluídas em água ultrapura. As soluções de trabalho, tanto das sulfonamidas quanto do florfenicol, foram preparadas diariamente.

#### 4.4. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas definidas para a separação e detecção das sulfonamidas foram baseadas e adaptadas de Malintan & Mohd (2006). Para a determinação de florfenicol em camarão e tilápia foram utilizadas as condições baseadas em Feng (2008). As condições encontram-se descritas na tabela abaixo.

**Tabela 8.** Condições cromatográficas utilizadas para a detecção e quantificação dos antimicrobianos

<i>Sulfonamidas</i>	Coluna	Merck C18 (150 x 3mm, 5µm) acoplada a uma coluna de guarda Merck (4 x 2mm, 5µm)
	Eluição tipo	Gradiente
	Fase móvel	(A) acetonitrila; (B) ácido acético 0,5%
	Fluxo fase móvel	1 mL min <sup>-1</sup>
	Detecção	227 nm
	Volume de injeção	50µL
	Tempo corrida	32 min
	Temperatura do forno	38°C
	<i>Florfenicol</i>	Coluna
Eluição tipo		Isocrática
Fase móvel		Acetonitrila-água (25:75)
Fluxo fase móvel		1 mL min <sup>-1</sup>
Detecção		223 nm
Volume de injeção		50µL
Tempo corrida		10 min
Temperatura do forno		Ambiente

#### 4.5. Matriz

Para os testes de validação utilizou-se como matriz camarão cultivado em sistema orgânico (*Litopenaeus vannamei*) com selo de qualidade da Associação de Certificação Instituto Biodinâmico - IBD (certificação para produtos orgânicos), coletada em uma fazenda de camarão do Rio Grande do Norte. A amostra foi coletada em sacos plásticos e enviada ao laboratório em caixa de isopor contendo sacos de gelo em cubos, chegando ainda congelada. As embalagens com 1 kg de camarão foram armazenadas em freezer (-18 a -22°C).

As amostras foram preparadas retirando-se a cabeça e a casca dos camarões previamente descongelados em geladeira. Um quilo de músculo foi triturado em liquidificador industrial até a obtenção de uma massa pastosa e homogênea que foi em seguida dividida em duas porções de aproximadamente 500g. Cada porção foi acondicionada em uma embalagem de alumínio com tampa, devidamente identificada e armazenada em freezer (-18 a -22°C) até o momento da utilização.

Para os testes de validação da metodologia de florfenicol em tilápia utilizou-se como matriz o peixe adquirido em supermercado. A amostra foi enviada ao laboratório já congelada e foi preparada retirando-se apenas a espinha dorsal do peixe, seguida de homogeneização em liquidificador industrial. A massa obtida foi dividida em duas porções de aproximadamente 500g que foram acondicionadas em embalagens de alumínio com tampa. As amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-18 a -22°C).

#### 4.6. Procedimento de análise



#### **4.6.1. Sulfonamidas em camarão**

O método de análise foi baseado em Stubbings et al. (2005) e modificado para as condições de estudo. Cerca de 5,0g de amostra foi cuidadosamente pesado em um tubo de centrífuga de 50 mL. A extração foi realizada adicionando-se 20 mL de acetonitrila, seguido de homogeneização com ultra-som por 3 minutos. Foram adicionados mais 10 mL de acetonitrila para lavar o ultra-som e adicionados ao tubo 10g de sulfato de sódio anidro. O extrato foi levado à agitação em mesa agitadora a 640 rpm por 10 minutos e centrifugado a 1700 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em 15 g de sulfato de sódio anidro, sendo o filtrado recolhido em um balão volumétrico de 100 mL. A extração foi repetida, o sulfato de sódio foi lavado com duas porções de 5 mL de acetonitrila e os extratos reunidos foram evaporados em evaporador rotativo a 40°C. ao resíduo seco foram adicionados 3 mL de uma solução acetonitrila:ácido acético (95:5) e esse extrato foi homogeneizado em vórtex antes de ser levado para o clean up em cartuchos do tipo SCX. O processo de limpeza foi realizado em um cartucho previamente condicionado com 5 mL da solução acetonitrila:ácido acético (95:5) que, depois da aplicação da amostra, foi lavado com 2,5 mL de acetona, 5 mL de metanol e 5 mL de acetonitrila. As sulfonamidas foram eluídas com 5 mL da solução acetonitrila:amoníaco (95:5) e o eluato foi cuidadosamente evaporado até a secura em evaporador rotativo a 40°C. O resíduo seco foi dissolvido em 1 mL de ácido acético 0,5%, homogeneizado em vórtex e filtrado em membrana (0,22 µm) acoplada a uma seringa, sendo o volume recolhido em um vial para posterior análise por CLAE.

#### **4.6.2. Florfenicol em camarão e tilápia**

O método de análise modificado foi baseado em Feng et al. (2008). Cerca de 1,0 g de amostra foi cuidadosamente pesado em um tubo de centrífuga de 50 mL. A extração foi realizada adicionando-se 2,5 mL de acetato de etila, seguido de homogeneização com ultra-som. A extração foi repetida com a adição de mais 2,5 mL de acetato de etila e o ultra-som lavado com outros 2,5 mL de acetato de etila recolhidos no tubo de centrífuga. Após centrifugação a 5000 rpm o sobrenadante foi reservado e o procedimento de extração repetido. Os sobrenadantes foram combinados e evaporados em evaporador rotativo a 50 °C. O resíduo seco foi dissolvido em 1 mL da fase móvel e 0,5 mL de hexano foi adicionado seguido de homogeneização em vórtex. Após homogeneização o extrato foi transferido para um tubo de Eppendorff e centrifugado por 20 min a 16000 rpm. A fase superior foi descartada e a fase aquosa (inferior) filtrada através de membranas (0,22 µm) acoplada a uma seringa e o filtrado recolhido em um vial para posterior análise por CLAE.

#### **4.7. Validação dos métodos**

Os métodos propostos foram validados segundo instruções do guia do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2007). Foram avaliados os parâmetros de seletividade, limite de detecção e quantificação do equipamento, linearidade, faixa dinâmica, efeito de matriz, limite de detecção e quantificação do método e recuperação.

##### **4.7.1. Seletividade**

Para observar a seletividade dos métodos foram preparados dois grupos de amostras (branco adicionado e matriz fortificada) em duplicata, ambos com o analito na concentração estabelecida (LMR). Foram obtidos 07 valores de medição de cada grupo de amostras e

calculados a média e desvio padrão das áreas dos analitos. A dispersão das medidas foi avaliada através do teste de Grubb e a variância das amostras foi verificada através de teste t de Student.

Após a aplicação do teste, se F calculado for menor que o F tabelado, as variâncias podem ser consideradas iguais, isto é, a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo. Neste caso, os desvios-padrão dos grupos de testes podem ser agrupados e a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada com a distribuição t de Student (INMETRO, 2007). Desse modo, calculam-se:

a)  $\bar{x}_1$  e  $\bar{x}_2$  = médias das respostas dos analitos em amostras “com matriz” e “sem matriz”, respectivamente, na mesma faixa de concentrações;

b)  $s_1$  e  $s_2$  = desvios-padrão das respostas desses mesmos analitos;

c) o valor:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (1)$$

onde  $s^2 = \frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$  (2) e  $n_1$  e  $n_2$  são os tamanhos das amostras 1 e 2

Se F calculado for maior que o F tabelado, as variâncias não podem ser consideradas iguais, ou seja, a matriz tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo, e o  $t_{\text{calculado}}$  é:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (3)$$

Neste caso, o número de graus de liberdade deve ser dado por:

$$\nu = \frac{\left( s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2 \right)^2}{\frac{\left( s_1^2/n_1 \right)^2}{n_1+1} + \frac{\left( s_2^2/n_2 \right)^2}{n_2+1}} - 2 \quad (4)$$

#### 4.7.2. Limite de detecção e de quantificação do equipamento (LDE e LQE)

Para o cálculo dos limites de detecção e quantificação do equipamento foram preparados brancos adicionados em diferentes concentrações. Para cada concentração foi calculada a relação sinal/ruído (s/r) para os analitos, utilizando os parâmetros de integração do equipamento. A partir da menor concentração para os analitos que produziu uma relação sinal/ruído aceitável foram obtidos 07 valores de medição em um mesmo dia. Os valores de dispersão das medidas foram avaliados através do teste de Grubb e os limites de detecção e quantificação do equipamento foram calculados de acordo com as equações abaixo:

##### Limite de detecção do equipamento (LDE)

$$\text{LDE} = 0 + t(n-1, 1-\alpha) \cdot (s) \quad (5)$$

Onde,

$t(n-1, 1-\alpha)$  = valor da abscissa (t-Student) para  $(1-\alpha) \times 100\%$  nível de confiança e  $(n-1)$  graus de liberdade;

s = desvio padrão das medições.

No caso de 7 repetições,  $7-1 = 6$  graus de liberdade, o valor de t unilateral para 99% de intervalo de confiança é 3,143.

Então,

$$\text{LDE} = 0 + 3,143 \cdot (s) \quad (6)$$

Limite de quantificação do equipamento (LQE):

$$\text{LQE} = 0 + 10 \cdot (s) \quad (7)$$

Onde, s = desvio padrão das medições.

#### 4.7.3. Linearidade

A partir dos valores do LQE foram definidos os limites inferiores e superiores da faixa de trabalho para a linearidade, sendo adotados como limite superior uma concentração que esteja adequada à aplicação do método e ao sistema de resposta do equipamento. Foram definidos, tanto para avaliação da linearidade em solução como na matriz, 07 níveis de concentração para compor a curva. Foram obtidos 07 valores de medição para cada concentração estabelecida e construídos gráficos da razão entre a concentração de cada analito/concentração do padrão interno (PI) versus a área do analito/área do padrão interno (PI). As equações de regressão linear e os coeficientes de correlação linear (r) foram calculados utilizando o software do equipamento. E a dispersão das medidas foi avaliada utilizando o teste de Grubb. As metodologias para determinação de florfenicol não utilizaram padrão interno, sendo a curva construída a partir da razão entre a concentração versus a área

do analito. Como critério de aceitação foi definido para o coeficiente de correlação um valor de  $r > 0,90$  (INMETRO, 2007).

#### **4.7.4. Faixa dinâmica**

Para cada teste de linearidade realizado, foi calculada a resposta relativa de cada concentração quando se estabelecem limites inferiores e superiores em torno da média. Foram construídos gráficos com a relação entre a resposta relativa e os valores de concentração em escala logarítmica. Um limite superior e inferior variando em torno de 10% da média foi estabelecido e as respostas relativas para as concentrações foram avaliadas devendo se encontrar dentro da faixa de variação estabelecida.

#### **4.7.5. Efeito de matriz**

Utilizando os valores de medição obtidos no teste de linearidade, foram comparados os valores de área entre os analitos em solução e no extrato da matriz. Foram avaliadas estatisticamente, através de teste t, as curvas de cada analito em solução e no extrato da matriz para definir se há diferenças ou semelhanças no grupo de medições, caracterizando ou não um efeito de matriz.

#### **4.7.6. Limite de detecção (LDM) e quantificação (LQM) do método**

Foram preparadas replicatas autênticas da matriz fortificada em diferentes concentrações. Para cada concentração foi calculada a relação sinal/ruído (s/r) para os

analitos. A partir da menor concentração para os analitos que produziu uma relação sinal/ruído entre 3 e 5 foram obtidos 07 valores de medição em um mesmo dia. Os valores de dispersão das medidas foram avaliados estatisticamente através de teste de Grubb e os Limites de Detecção (LDM) e Quantificação (LQM) do método foram calculados conforme as equações 2 e 3 (INMETRO, 2007).

#### 4.7.7. Recuperação

A partir da matriz fortificada a 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o LMR foram preparadas sete replicatas autênticas com adição do padrão interno. Os analitos foram quantificados por padronização a partir da curva de calibração estabelecida e a recuperação foi calculada através da equação 4 abaixo:

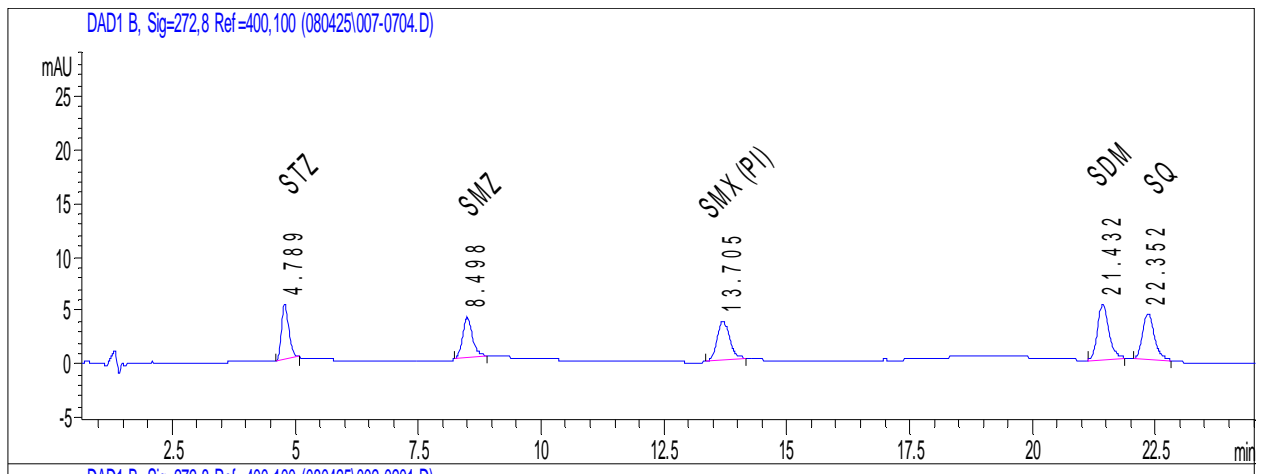
$$\text{Recuperação}(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \cdot 100 \quad (8)$$

Onde:  $C_1$  = concentração determinada na matriz fortificada;  
 $C_2$  = concentração determinada na matriz não fortificada  
 $C_3$  = concentração adicionada (teórica)

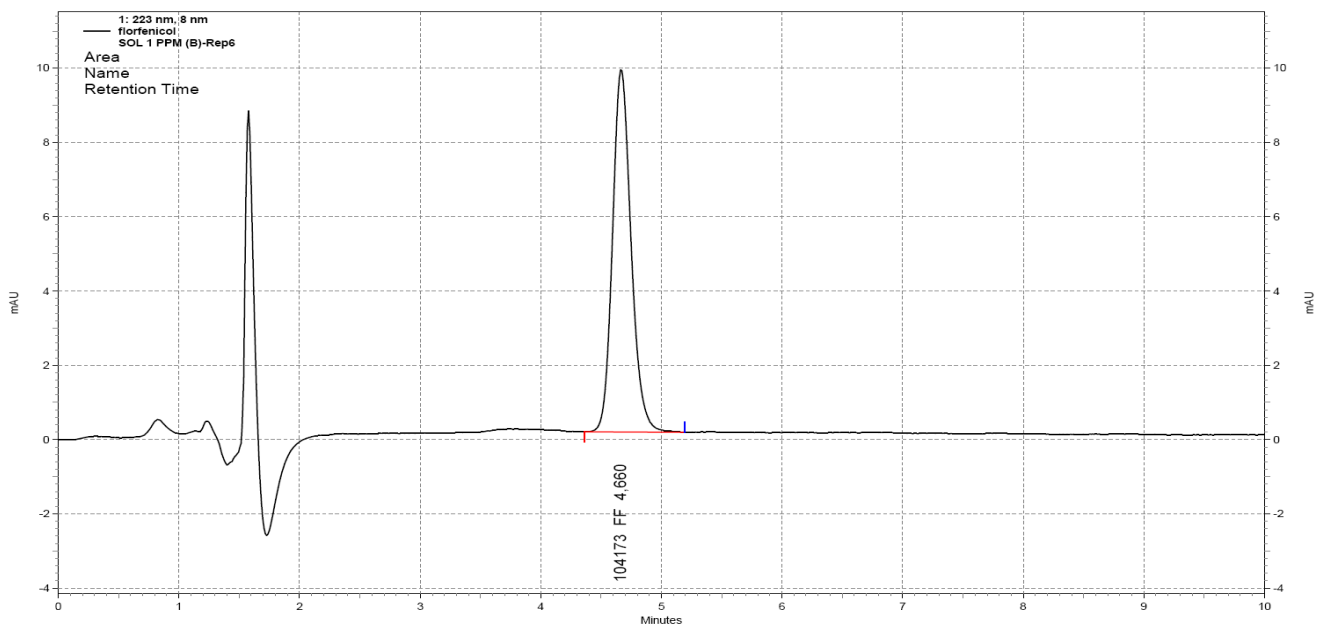
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas estabelecidas para a separação e detecção dos antimicrobianos em estudo forneceram cromatogramas típicos que podem ser observados nas figuras abaixo.



**Figura 6.** Cromatograma típico para a solução padrão de sulfonamidas a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (Cromatógrafo Agilent 1100).



**Figura 7.** Cromatograma típico para a solução padrão de florfenicol a  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (Cromatógrafo SHIMADZU).



Nas condições citadas, foi preparado, a partir da solução estoque, um *mix* para cada sulfonamida em uma concentração final de  $100\mu\text{g L}^{-1}$  tendo como diluente uma solução de ácido acético 0,5%. As sulfas apresentaram-se separadas de forma eficiente, não ocorrendo sobreposição de picos, considerando se tratar de um método multiresíduo. Estudos afirmam que a natureza anfotérica das sulfonamidas dificulta a separação em colunas do tipo C8, sendo observadas separações ótimas quando colunas do tipo C18 são utilizadas (MALINTAN & MOHD, 2006). Outras pesquisas demonstram que o uso do ácido acético 0,5% como fase móvel otimiza a resolução e sensibilidade dos picos (MALINTAN & MOHD, 2006; FUH & CHAN, 2001).

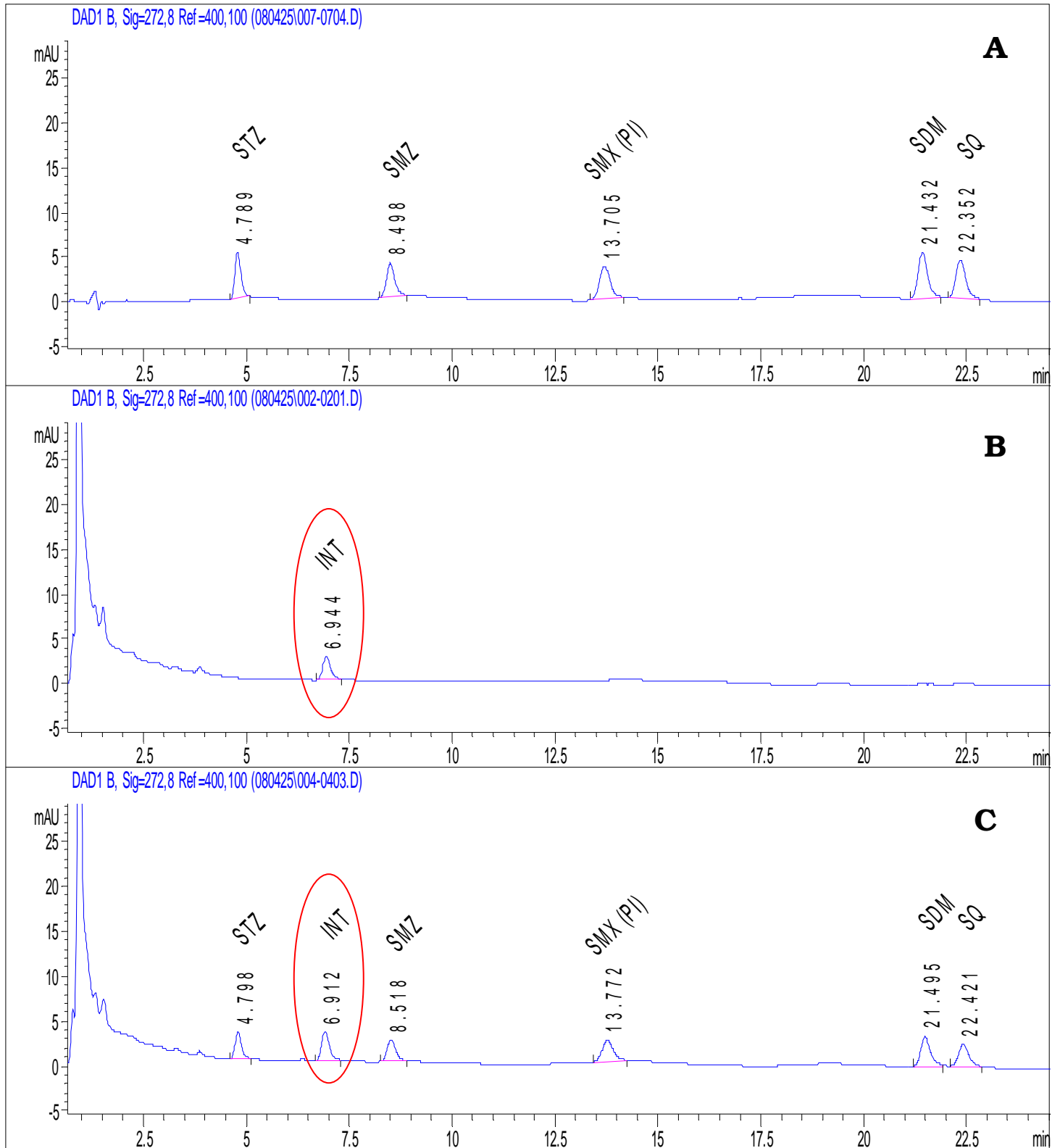
A solução padrão de florfenicol a  $1\text{ mg L}^{-1}$  foi preparada a partir da solução estoque utilizando água ultrapura como solvente. O florfenicol por sua vez não apresentou nenhuma dificuldade de separação nas condições estabelecidas tendo apresentado um sinal com excelente resolução.

## **5.2. Seletividade**

### **5.2.1 Sulfonamidas em camarão**

As matrizes animais apresentam uma complexidade de compostos em sua estrutura que dificulta a detecção e quantificação dos analitos. O teste de seletividade apresenta-se como uma ferramenta para avaliar a eficiência do método em distinguir os compostos de interesse de outros existentes na amostra. O método descrito para detecção de sulfonamidas em camarão demonstrou ser eficientemente seletivo, pois não foram observados picos interferentes no tempo de retenção das SAs na matriz, além de existir concordância entre os tempos de retenção dos analitos na solução de trabalho e na matriz fortificada. Os tempos de retenção aproximados para as espécies (em minutos) foram: sulfatiazol, 4,6; sulfametazina,

8,2; sulfametoxazol (PI), 13,4; sulfadimetoxina, 21,2 e sulfaquinoxalina, 22,3. Um interferente da matriz é observado no tempo de retenção de 6,9 aproximadamente (figura 8).



**Figura 8.** Cromatogramas típicos para sulfonamidas em camarão. (A) Solução padrão a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; (B) Branco da matriz; (C) Matriz fortificada a 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Cromatógrafo Agilent 1100)

A avaliação estatística da seletividade do método foi feita inicialmente com a aplicação do teste F. Os resultados demonstraram que para todas as sulfonamidas o valor de F calculado foi maior que o de F tabelado (tabela 9), sendo então as variâncias consideradas desiguais.

**Tabela 9.** Valores de F calculados e tabelados para cada sulfonamida

<i>Analito</i>	<i>F<sub>calc</sub></i>	<i>F<sub>tab</sub></i>	<i>Conclusão</i>
STZ	220,99	2,57	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$
SMZ	556,09	2,57	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$
SMX	924,57	2,57	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$
SDM	2222,54	2,57	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$
SQ	1257,39	2,57	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$

Aplicando o teste t de Student para variáveis não homogêneas (desiguais), obteve-se um valor de  $t_{\text{calc}}$  maior que o valor de  $t_{\text{tab}}$  para todas as sulfonamidas. Nesse caso fica demonstrado estatisticamente que a matriz tem um efeito importante sobre a precisão do método (tabela 10).

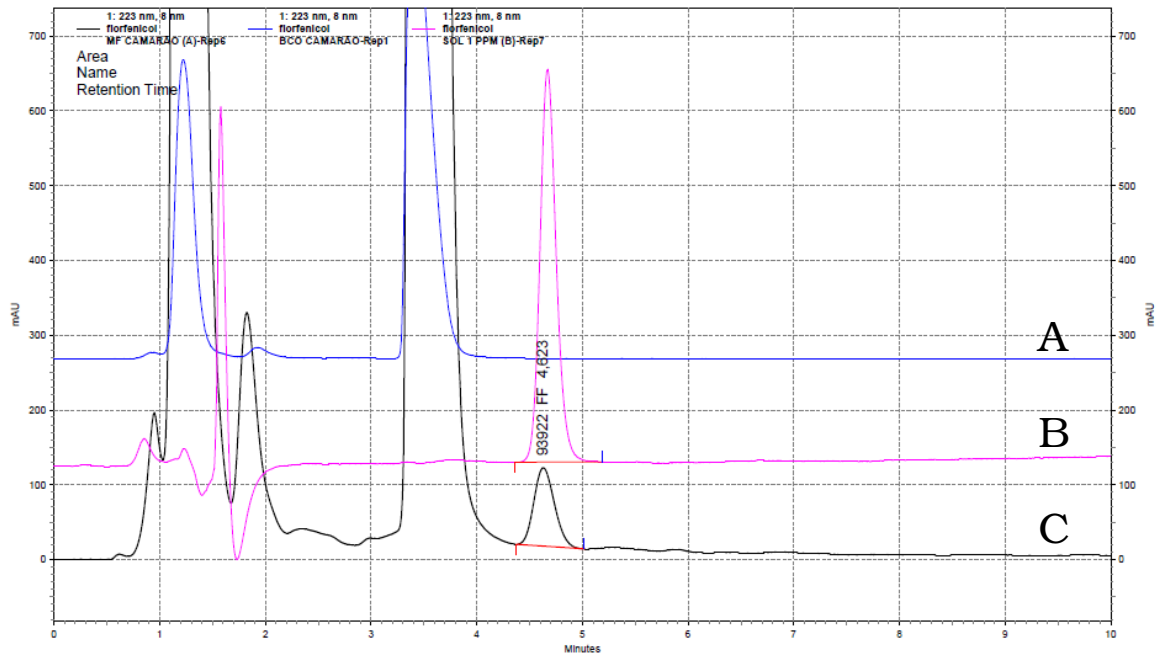
**Tabela 10.** Valores de t calculados e tabelados (95%) para cada sulfonamida

<i>Analito</i>	<i>t<sub>calc</sub></i>	<i>t<sub>tab</sub></i>	<i>v*</i>
STZ	14,314	1,771	13
SMZ	12,286	1,771	13
SMX	11,183	1,771	13
SDM	12,157	1,771	13
SQ	16,501	1,771	13

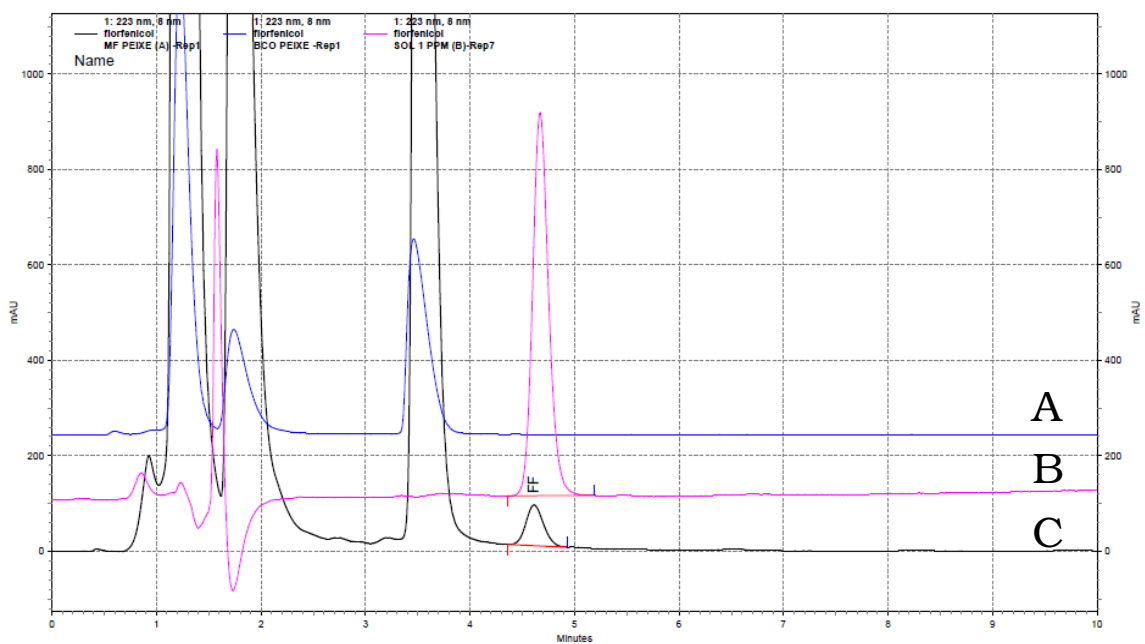
\* Calculado de acordo com a equação (4)

### 5.2.2 Florfenicol em camarão e tilápia

O método para determinação de florfenicol apresentou-se seletivo, pois não foram observados interferentes eluindo no tempo de retenção do florfenicol em nenhuma das duas matrizes estudadas (figura 9).



**Figura 9.** Cromatograma típico para matriz camarão: (A) Branco da matriz; (B) Solução padrão de florfenicol a  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ; (C) Matriz fortificada a  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (Cromatógrafo SHIMADZU).



**Figura 10.** Cromatograma típico para matriz peixe: (A) Branco da matriz; (B) Solução padrão de florfenicol a  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ; (C) Matriz fortificada a  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (Cromatógrafo SHIMADZU).

A avaliação estatística demonstrou, através da aplicação do teste F, que para as duas matrizes o valor de F calculado apresentou-se menor que o valor de F tabelado indicando um conjunto de dados homogêneo (tabela 11).

**Tabela 11.** Valores de F calculados e tabelados para o florfenicol

<i>Matriz</i>	<i>F<sub>calc</sub></i>	<i>F<sub>tab</sub></i>	<i>Conclusão</i>
<b>Peixe</b>	1,82	2,57	$F_{calc} < F_{tab}$
<b>Camarão</b>	1,79	2,57	$F_{calc} < F_{tab}$

O teste t aplicado para variáveis equivalentes evidenciou que as matrizes exercem influência na precisão do método, influência demonstrada pelo valor de  $t_{calc}$  maior que o valor de  $t_{tab}$  (tabela 12).

**Tabela 12.** Valores de t calculados e tabelados (95%) para o florfenicol

<i>Matriz</i>	<i>t<sub>calc</sub></i>	<i>t<sub>tab</sub></i>
Peixe	13,499	1,771
Camarão	14,403	1,771

\* Calculado de acordo com a equação (3)

### 5.3. Limites de detecção e quantificação do equipamento

#### 5.3.1 Sulfonamidas em camarão

Os limites de detecção e quantificação do equipamento foram calculados através da relação sinal/ruído para cada sulfonamida que foi obtida a partir de sete injeções de uma solução de trabalho a uma concentração de  $8 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os resultados para relação sinal/ruído das soluções de sulfonamidas encontram-se descritos na tabela abaixo.

**Tabela 13.** Relação sinal/ruído para cada sulfonamida em ácido acético 0,5%

<i>SAs</i>	<i>Concentração</i> <i>(<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</i>	<i>Média</i> <i>do sinal (altura)</i>	<i>Média dos</i> <i>ruídos (altura)</i>	<i>Relação</i> <i>S/R</i>
STZ		0,0724		12,36
SMZ		0,0528		9,01
SMX	8	0,0559	0,0058	9,54
SDM		0,0794		13,55
SQ		0,0670		11,43

A partir do desvio padrão das áreas obtidas para as sete injeções das SAs em solução de ácido acético 0,5%, calculou-se o LDE e LQE de acordo com INMETRO (2007). As menores concentrações que podem ser quantificadas pelo cromatógrafo utilizado variaram entre 6,90 e  $15,21 \mu\text{g L}^{-1}$  (tabela 14).

**Tabela 14.** Limites de detecção e quantificação do equipamento calculados para as sulfonamidas em solução de ácido acético 0,5%.

	<i>LDE</i>		<i>LQE</i>	
	<i>Concentração</i> <i>SAs (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</i>	<i>ng de SAs</i> <i>em <math>50\mu\text{L}^*</math></i>	<i>Concentração</i> <i>SAs (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</i>	<i>ng de SAs</i> <i>em <math>50\mu\text{L}^*</math></i>
STZ	2,017	0,100	6,420	0,321
SMZ	4,249	0,212	13,521	0,676
SMX	2,862	0,143	9,107	0,455
SDM	2,747	0,137	8,741	0,437
SQ	3,248	0,162	10,335	0,516

\* volume de injeção de  $50 \mu\text{L}$

### 5.3.2 Florfenicol em camarão e tilápia

A relação sinal/ruído e o LDE e LQE para a determinação de florfenicol foram calculados a partir de sete injeções de uma solução a uma concentração de  $8 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo possível quantificar, a partir de  $50\mu\text{L}$  injetados, uma massa de  $0,70 \text{ ng}$  de florfenicol de acordo com a tabela abaixo.

**Tabela 15.** Relação sinal/ruído e limites de detecção e quantificação para o florfenicol em água

	<i>Concentração (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</i>	<i>Média do sinal (altura)</i>	<i>Média dos ruídos (altura)</i>	<i>Relação S/R</i>
FF	8	68	23	3,02
<i>LDE</i>		<i>LQE</i>		
	<i>Concentração FF (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</i>	<i>ng de FF em 50<math>\mu\text{L}</math>*</i>	<i>Concentração FF (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</i>	<i>ng de FF em 50<math>\mu\text{L}</math>*</i>
	4,40	0,22	14,01	0,70

\* volume de injeção de  $50 \mu\text{L}$

### 5.4. Linearidade

A curva analítica representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. A linearidade determina até que ponto esta relação se mantém linear. É possível, a partir da curva analítica, calcular valores de concentração dos analitos utilizando os valores de áreas ou alturas obtidos. Segundo o INMETRO (2007) e MAPA (2008) a curva deve ser construída em torno do LMR tendo em vista que o objetivo principal do método é quantificar resíduos de drogas veterinárias.

#### 5.4.1. Linearidade sulfonamidas em camarão

As curvas analíticas para as sulfonamidas em camarão foram construídas usando o procedimento de fortificação do extrato da matriz pelo método de padronização interna, sendo a curva linear o resultado da plotagem entre a concentração de STZ/PI, SMZ/PI, SDM/PI e SQ/PI, versus a área dos analitos/área do padrão interno. A sulfametoxazol foi a substância escolhida como padrão interno e foram feitas sete injeções de cada nível da solução padrão e de cada nível do extrato da matriz fortificado nas concentrações de 100, 200, 400, 500, 600, 800 e 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  e as curvas foram construídas a partir dos valores médios de área para cada concentração estabelecida. As equações das retas e os coeficientes de relação linear ( $r$ ) para as sulfonamidas em solução e no extrato da matriz estão descritos na tabela abaixo. O INMETRO (2007) estabelece como critério de aceitação um coeficiente de correlação linear  $> 0,90$ .

**Tabela 16.** Equações da reta e coeficientes de correlação para as sulfonamidas

Solução	$r$	Extrato Matriz
Equação reta $y =$ <b>0,885365x</b> - <b>0,0599506</b>	<b>0,9992</b>	Equação reta $y =$ <b>0,805840x</b> - <b>0,0318366</b>
$y =$ <b>0,915912x</b> - <b>0,0813814</b>	<b>0,9988</b>	$y =$ <b>0,862570x</b> - <b>0,0283759</b>
$y =$ <b>1,10785x</b> + <b>0,0499149</b>	<b>0,9984</b>	$y =$ <b>1,00296x</b> + <b>0,0590413</b>

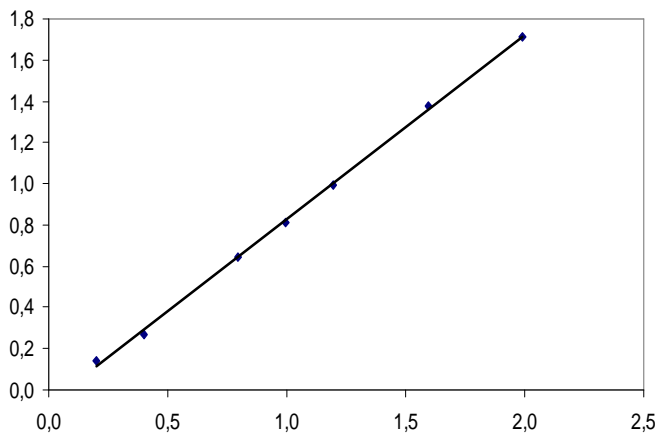


$$y = 1,00153x + 0,0337796$$

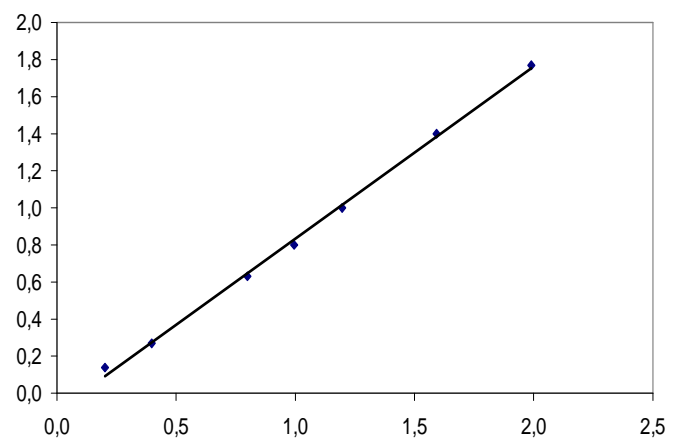
0,9984

$$y = 0,853327x + 0,0698142$$

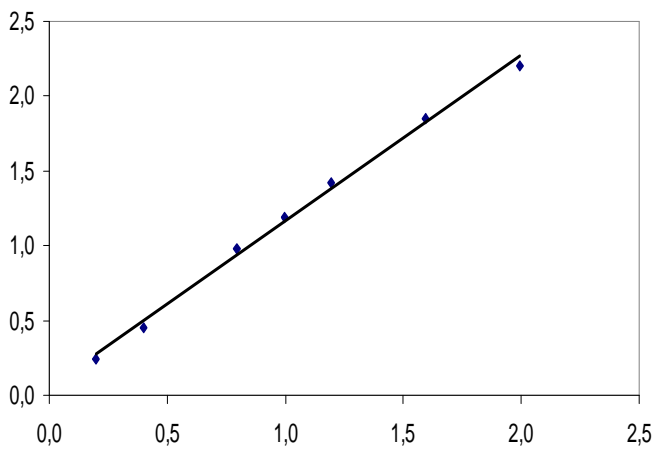
STZ



SMZ



SDM



SQ

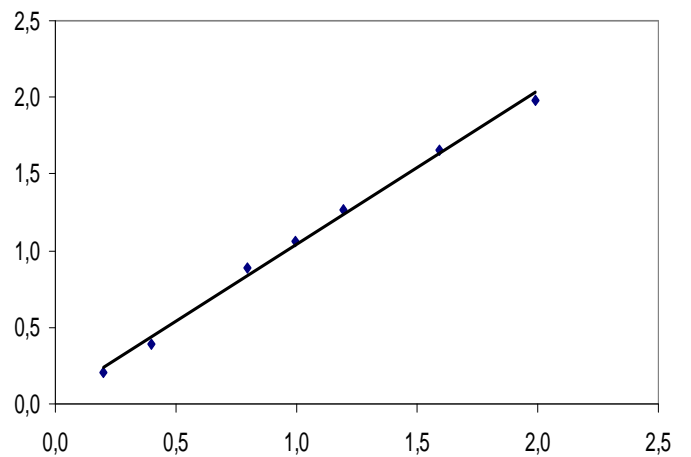
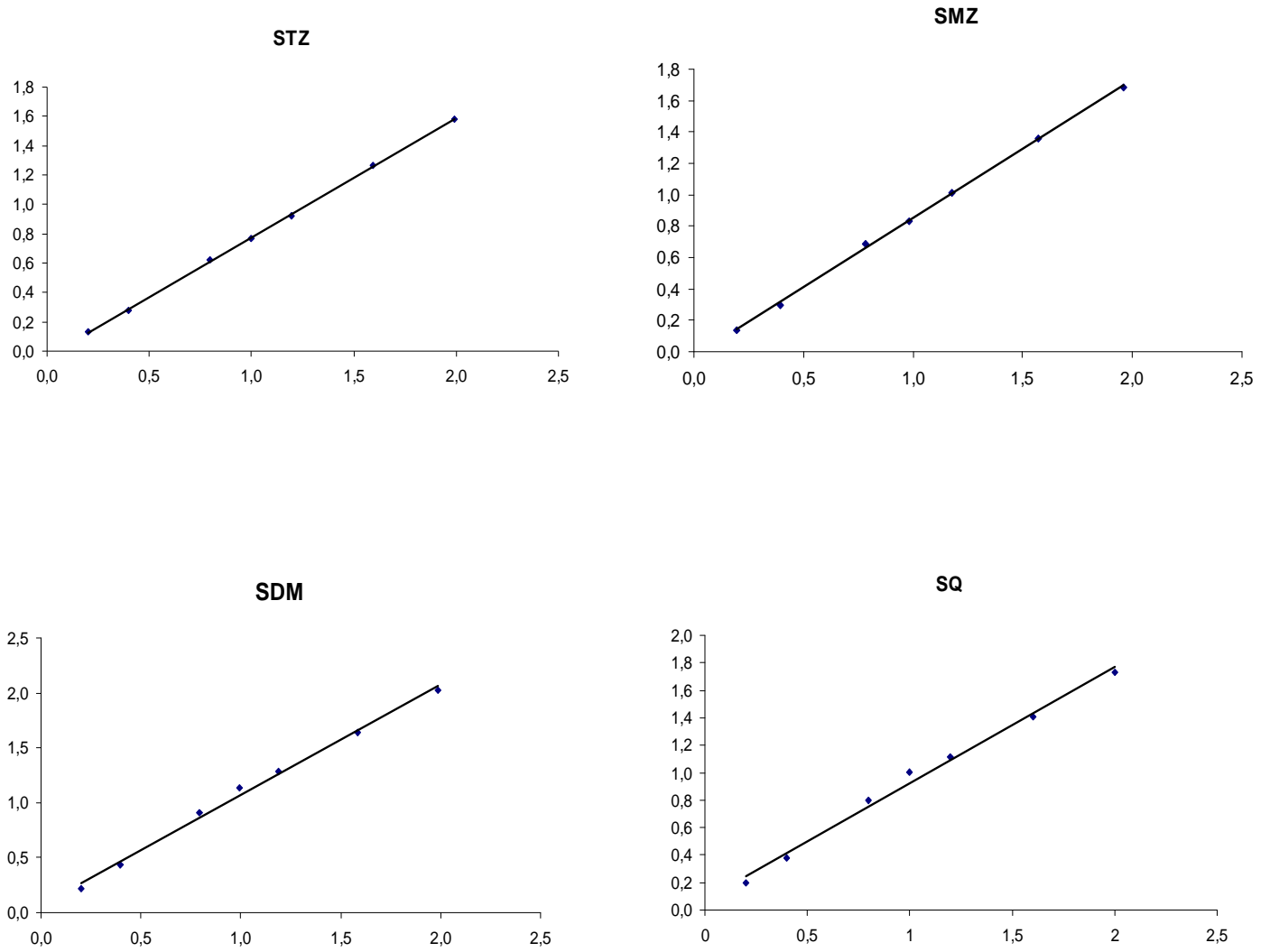


Figura 11. Curvas analíticas para as sulfonamidas em solução de ácido acético 0,5% (valores médios de razão de área obtidos)



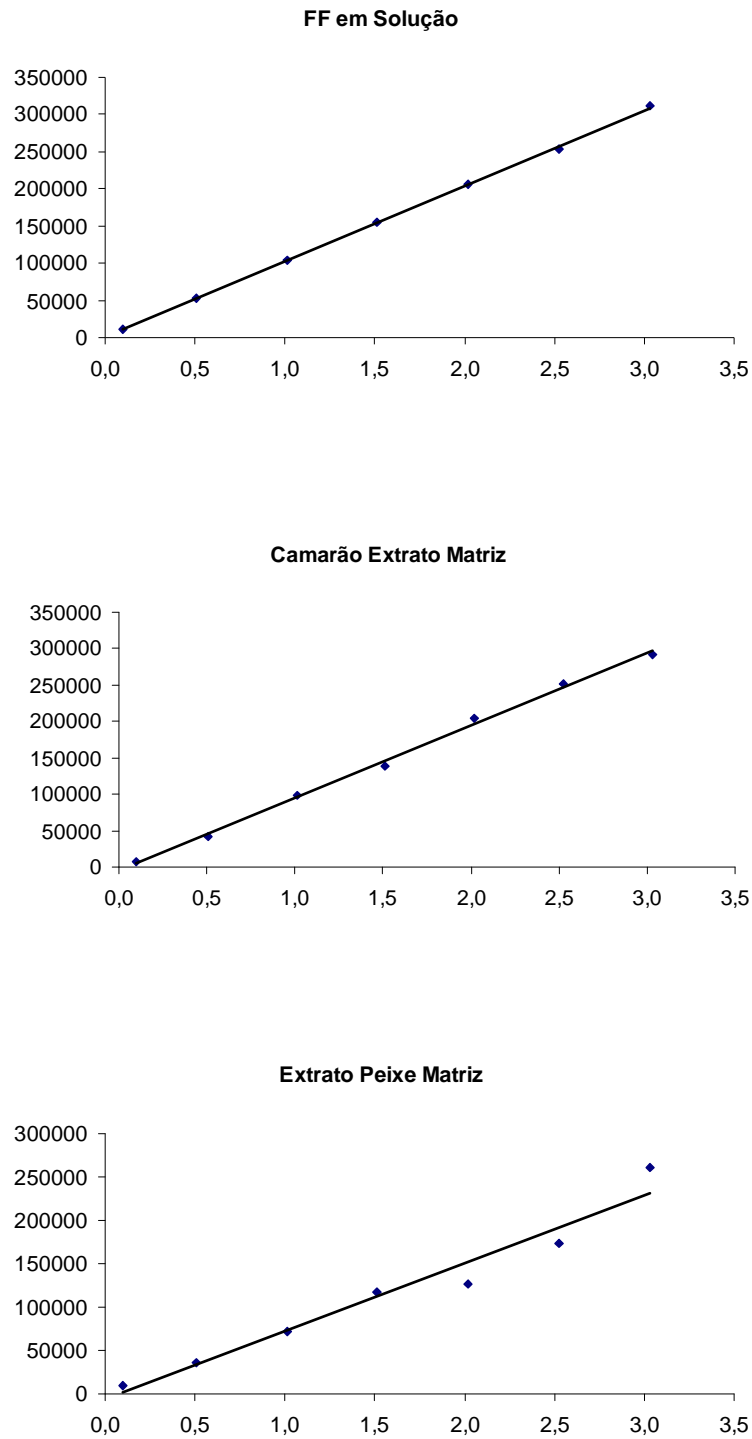
**Figura 12.** Curvas analíticas para as sulfonamidas no extrato da matriz fortificada (valores médios de razão de área obtidos)

#### 5.4.2. Linearidade florfenicol em camarão e tilápia

A fortificação do extrato da matriz também foi o método utilizado para a determinação de florfenicol em camarão e tilápia. Diferentemente das sulfonamidas, para este antibiótico não foi utilizada a padronização interna, sendo a curva construída como resultado gráfico da relação entre a concentração de florfenicol versus área. As concentrações escolhidas foram 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 mg L<sup>-1</sup> e foram feitas sete injeções de cada nível da solução padrão e de cada nível dos extratos fortificados de camarão e tilápia para construir as curvas a partir dos valores médios de área para cada concentração estabelecida. A tabela 17 resume as equações da reta e os coeficientes de correlação para as curvas do florfenicol nas duas matrizes admitindo como critério requerido para validação pelo INMETRO um coeficiente de correlação linear > 0,90.

**Tabela 17.** Equações da reta e coeficientes de correlação para o florfenicol

	Solução		Extrato Matriz
<i>Equação reta</i>		<i>r</i>	<i>Equação reta</i>
			y = 78170x - 6027,7
y = 101731x + 388,19		0,99990	y = 99427x - 4218,6



**Figura 13.** Curvas analíticas para o florfenicol em solução e no extrato fortificado das matrizes (valores médios de razão de área obtidos)

Uma otimização criteriosa do método permite que o primeiro nível da curva seja um valor de concentração bem abaixo do LMR estabelecido para as substâncias em questão requisito importante para detectar quantidades cada vez menores dos antimicrobianos nas matrizes.

### 5.5. Faixa dinâmica

Considerar apenas como satisfatórios os resultados dos cálculos de regressão linear não é suficiente para avaliar a linearidade do método pois a relação linear só é válida dentro de um determinado intervalo de massas ou concentrações, dentro do qual se pode construir uma curva linear. A esse intervalo dá-se o nome de faixa linear dinâmica (MAMANI, 2007; RIBANI, 2004). Para a construção do gráfico da faixa linear dinâmica, foram obtidas, a partir dos resultados do teste de linearidade, respostas relativas no eixo y e as concentrações correspondentes, em escala logarítmica no eixo x. Foram desenhadas outras linhas horizontais paralelas no gráfico e admitiu-se que o método é linear até o ponto onde a resposta relativa intercepta as linhas definidas no gráfico (RIBANI, 2004).

Existem diversas recomendações sobre a construção do gráfico da faixa linear dinâmica: o Guia de Validação do MAPA sugere um exame do perfil do gráfico dos resíduos da regressão (MAPA, 2008), para fármacos a ICH recomenda uma variação de  $\pm 20\%$  do valor declarado ou esperado, a ANVISA especifica um intervalo entre 80 – 120% da concentração teórica para fármacos e medicamentos (RIBANI, 2004). Optamos por definir um intervalo inferior e superior variando em 15% baseados no coeficiente de variação recomendado pelo Codex Alimentarius (2003). Os gráficos a seguir demonstram as faixas

dinâmicas para os métodos de determinação de sulfonamidas em camarão e florfenicol em camarão e peixe. É recomendado que os pontos que se encontram fora na faixa dinâmica estabelecida não devem ser utilizados na construção da curva de calibração para quantificação dos analitos. A SDM e a SQ apresentaram apenas dois pontos dentro da faixa linear dinâmica estabelecida (figura 14).

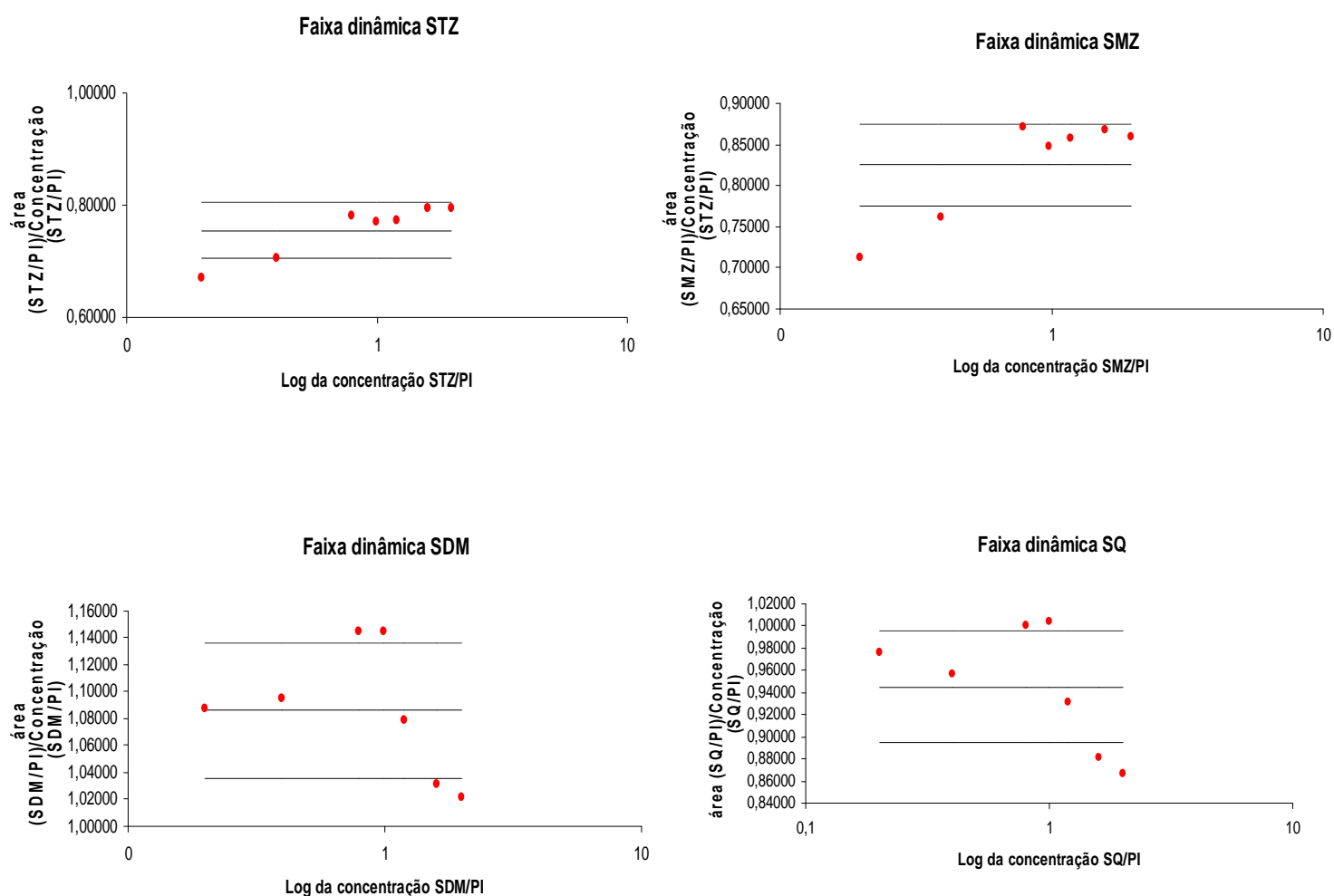
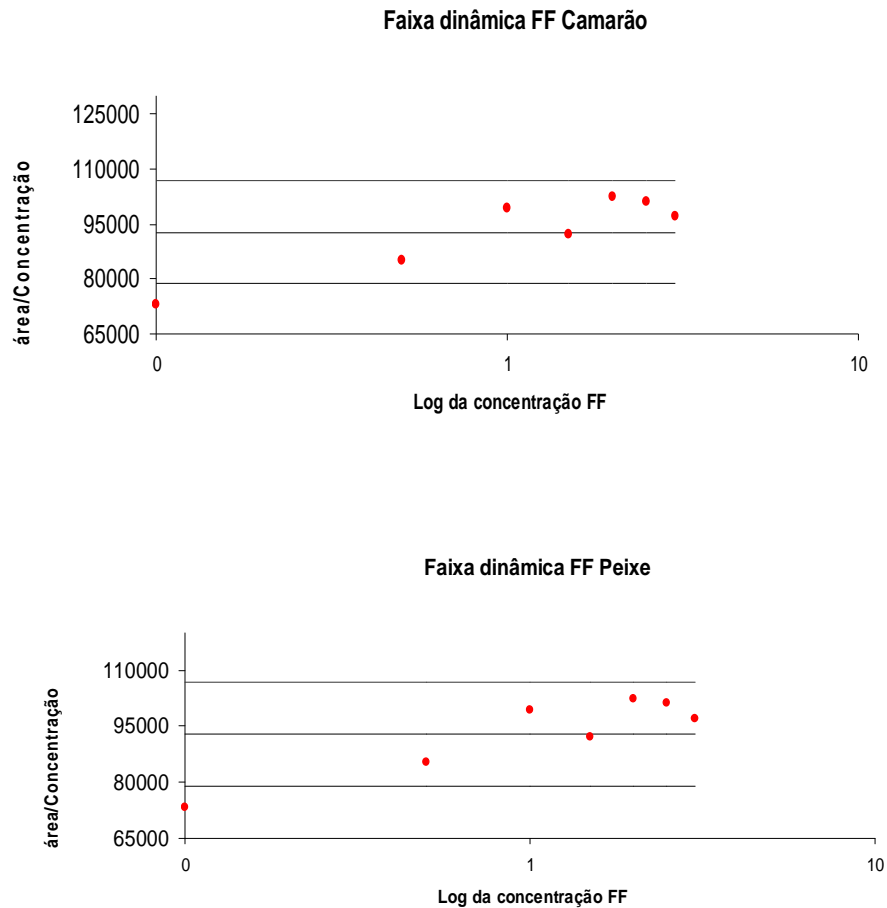


Figura 14. Gráficos de faixa linear dinâmica para as sulfonamidas no extrato da matriz

Na figura 15 é possível observar que na determinação de florfenicol em tilápia e em camarão apenas o primeiro ponto estabelecido da curva não se encontra dentro da faixa dinâmica estabelecida.



**Figura 15.** Gráficos de faixa linear dinâmica para o florfenicol em camarão e tilápia

## 5.6 Efeito de matriz

O teste de efeito de matriz avalia a influência de uma matriz complexa e seus componentes na determinação e quantificação dos analitos de interesse. Estudos indicam que negligenciar o efeito da matriz sobre o método em estudo compromete de forma significativa a precisão, a seletividade e a sensibilidade do método (CARDOSO, 2008; MATUSZEWSKI, 2003; RIBANI, 2004). A avaliação do efeito de matriz é feita pela comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas plotadas a partir das injeções da solução padrão e do extrato da matriz fortificada do antimicrobiano estudado.

Os testes estatísticos t de Student e teste F são indispensáveis no estudo sobre o efeito de matriz, pois indicam homogeneidade da amostra e a conseqüente influência da matriz no método. Para as sulfonamidas foram feitas sete injeções de dois grupos de amostras, a solução *mix* padrão e a matriz fortificada, ambas nos níveis de 200, 400, 800, 1000, 1200, 1600, 2000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os valores de áreas obtidos desses dois grupos de amostras são agrupados e analisados segundo a equação (3) e (4) e o resultado obtido após a estatística encontra-se resumido na tabela 18.

**Tabela 18.** Resultado dos testes estatísticos para avaliação de efeito de matriz para as sulfonamidas em camarão.

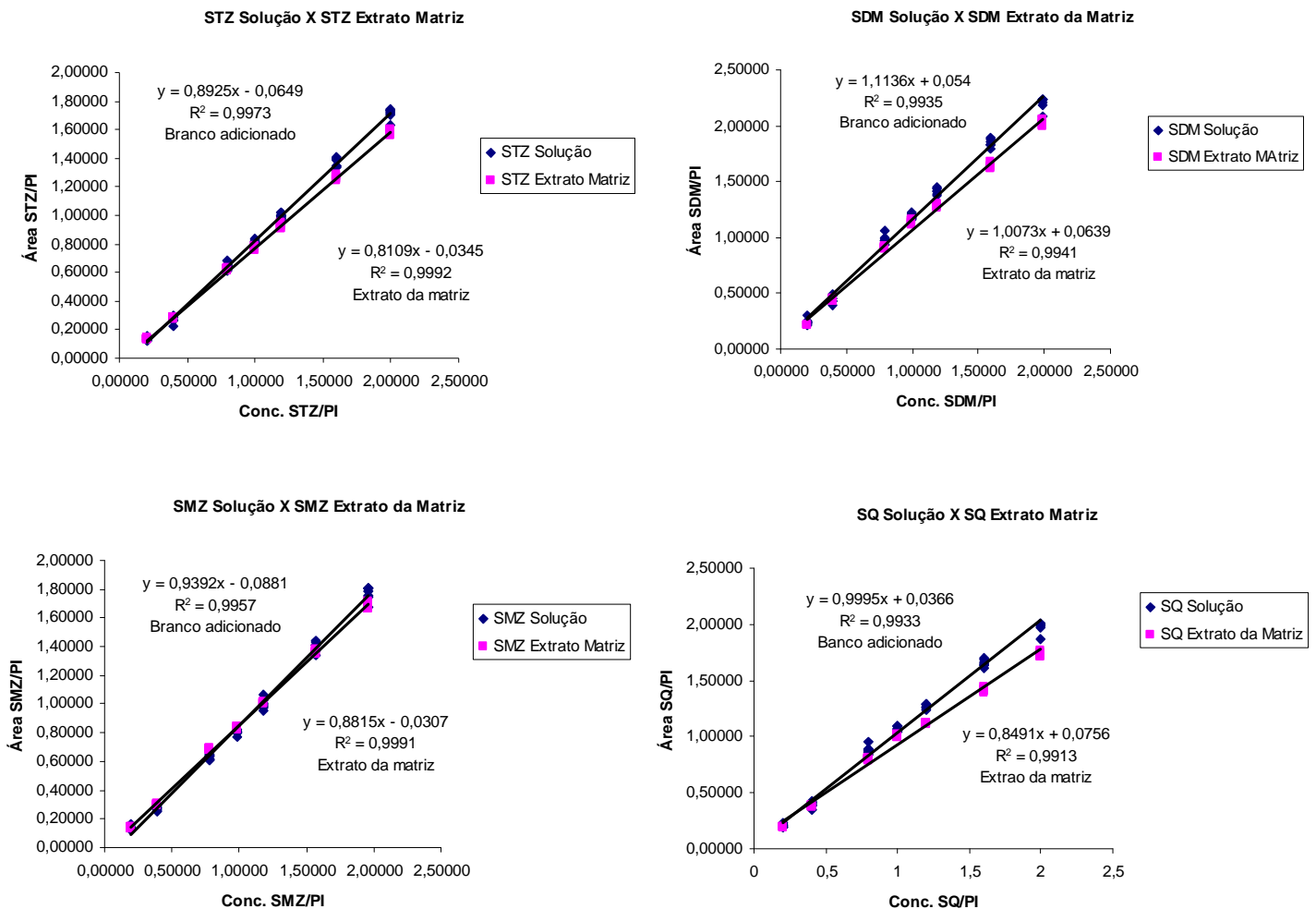
<i>Analito</i>	$F_{calc}$	$F_{tab}^*$	<i>Conclusão</i>	$t_{calc}$	$t_{tab}$	<i>Conclusão</i>
STZ	1,213			0,518		
SMZ	1,139	1,615	$F_{calc} < F_{tab}$	0,007	1,984	$t_{calc} < t_{tab}$
SDM	1,222		(Variâncias homogêneas)	0,774		
SQ	1,382			1,032		

\* n = 49 observações

Através dos testes aplicados concluímos que não há diferença significativa entre as curvas analíticas preparadas em solvente e na matriz para as sulfonamidas, fato que fica mais

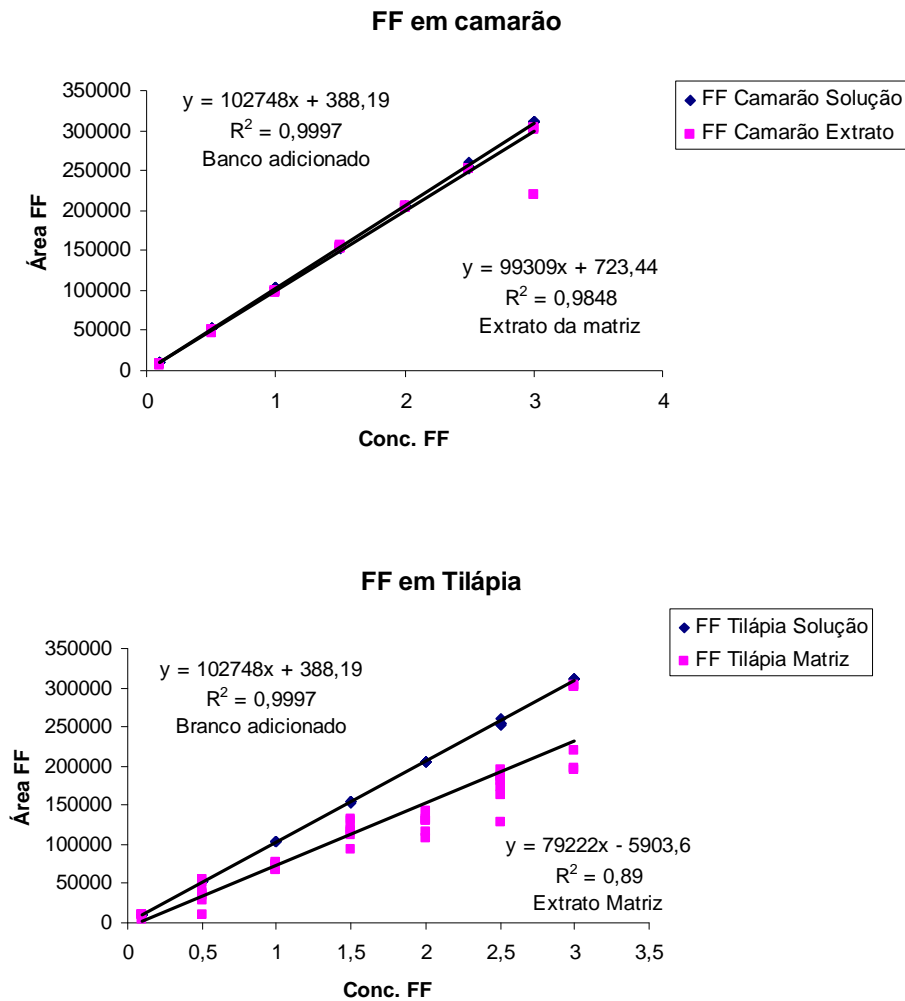


bem evidenciado graficamente quando se observa que duas curvas praticamente se sobrepõem. A SDM e a SQ apresentam valores maiores de t calculado e uma variação maior de sobreposição evidenciando um maior efeito de matriz nestes analitos.



Para o florfenicol em camarão e tilápia, os valores de F calculados apresentaram-se menores que os valores de F tabelado. Ao aplicar o teste t para variâncias equivalentes para a

matriz camarão, o valor de t calculado mostrou-se muito menor que o tabelado. Em contrapartida, na matriz tilápia o valor de t calculado foi bem maior que o tabelado para a quantidade de injeções feitas, deixando evidente o efeito de matriz para esta determinação.



**Figura 17.** Representação gráfica das curvas analíticas para o florfenicol em tilápia e camarão

### 5.7 Limite de quantificação do método

Para o método de determinação de sulfonamidas em camarão os limites de detecção e quantificação foram calculados para uma concentração de  $4 \mu\text{g kg}^{-1}$  e todos se encontram em conformidade com os valores requeridos pelo Ministério da Agricultura (MAPA, 2008). Os limites para a sulfatiazol foram 6,35 e 20,19, para a sulfametazina 2,44 e 7,76, para a sulfametoxazol 0,58 e 1,83, para a sulfadimetoxina 1,49 e 4,75 e para a sulfaquinoxalina 3,41 e  $10,85 \mu\text{g kg}^{-1}$  para os limites de detecção e quantificação do método respectivamente.

Para a determinação de florfenicol em camarão o limite de detecção e quantificação do método foram  $2,97$  e  $15,01 \mu\text{g kg}^{-1}$  respectivamente. Para a matriz tilápia as menores concentrações detectadas e quantificadas pelo método foram de  $3,64$  e  $18,54 \mu\text{g kg}^{-1}$  respectivamente.

### 5.8 Recuperação

A exatidão mede o quanto o valor obtido na análise está próximo do valor verdadeiro presente da amostra, e pode ser determinada através da análise de materiais certificados, fazendo-se a comparação entre dois métodos, sendo um deles, o método oficial ou de referência, ou então, através de testes de recuperação, onde quantidades conhecidas do analito são adicionadas a matriz em um processo de fortificação. (MAMANI, 2007; RIBANI, 2004). A porcentagem de recuperação é definida como a relação entre a concentração determinada para uma amostra fortificada e a concentração adicionada na fortificação.

As análises foram realizadas conforme o procedimento estabelecido e as concentrações calculadas pela curva analítica. A recuperação (exatidão) é obtida pela equação (8). Para tanto, sete replicatas do branco da matriz foram fortificadas nas concentrações de 50,

100 e 150  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e analisadas em triplicata no mesmo dia. Os valores de recuperação variaram na faixa de 79,95 a 98% encontrando-se de acordo com os valores estipulados pelo MAPA, Codex Alimentarius e pela Comissão Européia, Diretiva 2002/657/CE, confirmando a exatidão do método.

**Tabela 19.** Recuperações das sulfonamidas em diferentes níveis de concentração.

<b>Recuperação <math>\pm</math> RSD, %</b>		
<b>STZ</b>	<b>SMZ</b>	<b>SDM</b>
<b>79,95 <math>\pm</math> 10</b>	<b>81 <math>\pm</math> 7</b>	<b>82 <math>\pm</math> 6</b>
<b>80 <math>\pm</math> 17</b>	<b>96 <math>\pm</math> 12</b>	<b>85 <math>\pm</math> 15</b>
<b>83 <math>\pm</math> 20</b>	<b>98 <math>\pm</math> 18</b>	<b>87 <math>\pm</math> 18</b>

Para o cálculo da recuperação de florfenicol em camarão e tilápia foram utilizadas sete replicatas do branco da matriz fortificada nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5  $\text{mg L}^{-1}$ . Os valores de recuperação para florfenicol em camarão e tilápia foi calculada por padronização externa estando os valores de porcentagem em conformidade com os órgãos regulamentadores (tabela 20).

**Tabela 20.** Recuperações do florfenicol em diferentes níveis de concentração.

Fortificação (mg kg <sup>-1</sup> )	Recuperação ± RSD, %	
	Camarão	Tilápia
0,5	95 ± 12	97 ± 9
1,0	100 ± 10	98 ± 14
1,5	98 ± 15	100 ± 18

## **6. CONCLUSÕES**

Os métodos validados para determinação de antimicrobianos em pescado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência associada ao detector por arranjo de diodos se mostraram adequados para a determinação simultânea de STZ, SMZ, SDM e SQ em camarão e para a determinação de florfenicol em camarão e tilápia. Os limites de quantificação e os demais parâmetros de validação se demonstraram adequados e em conformidade com os critérios estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, pelo INMETRO e pela Comunidade Européia. As metodologias então validadas irão contribuir para o desenvolvimento da região a partir da garantia de segurança alimentar e comprometimento com o meio ambiente.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. **Estatísticas nacionais e internacionais**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fi>> Acesso em: 15 jan. 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. **Carcinicultura: Produção, demanda e processo tecnológico com responsabilidade ambiental e compromisso social**. Revista da ABCC, n. 01, set. 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE TILÁPIA. **Histórico**. Disponível em: <<http://www.abtilapia.com.br>> Acesso em: 15 fev. 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 2005.

ANNE-CLAIRE, M.; ZEGGANE, S. HPLC determination of sulphathiazole in French honeys. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 26, p. 953–961, 2003.

BARBIERI-JR, R. C.; OSTRENSKY-NETO, A. **Camarões marinhos: reprodução, maturação e larvicultura**. Viçosa: Aprenda Fácil. p. 81-99. 2001.

BERZAS-NEVADO, J. J.; CASTAÑEDA-PEÑALVO, G.; GUZMÁN-BERNARDO, F. J. Simultaneous determination of sulphamethoxypyridazine, sulphamethoxazole, sulphadimethoxine and their associated compounds by liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 442, p.241–248, 2001.

BOGIALLI, S.; CURINI, R.; CORCIA, A. D. I.; NAZZARI, M.; POLCI, M. L. Rapid confirmatory assay for determining 12 sulphonamide antimicrobials in milk and eggs by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 4225–4232, 2003.

BRITO, N. M.; AMARANTE-JR., O. P.; OLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p.129-146, 2003.

CABALLERO, R. D.; TORRES-LAPASÍO, J. R.; BAEZA-BAEZA, J. J.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M. C. Micellar chromatographic procedure with direct injection for the determination of sulphonamides in milk and honey samples. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technology**, v. 24, p. 117–131, 2001.

CAMPBELL, K. L. Sulphonamides: updates on use in veterinary medicine. **Veterinary Dermatology**, v. 10, p. 205-215.

CARNEIRO, D. O.; FIGUEIREDO, H. C. P.; PEREIRA JUNIOR, D. J.; LEAL, C. A. G.; LOGATO, P. V. R. Perfil de Susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 4, v. 59, p. 869-876, 2007.

CEE. Comissão da Comunidade Européia. **Diretiva da Comissão 2002/657/EC de 12 de Agosto de 2002**. Jornal Oficial das Comunidades Européias. Bruxelas, 2002. 28p.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**. São Paulo: Edgard Blücher, 2003. 179p.

CODEX ALIMENTARIUS. Revisión del los critérios basados en el rendimiento de los métodos de análisis para los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Roma: **Codex Alimentarius**, nov. 2003.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S (organizadores). **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006. 453 p.

CROUBLES, S. et al. Practical approach for the stability testing of veterinary drugs in solutions and in biological matrices during storage. **Analytica Chimica Acta**, n. 483, p. 419-427, 2003.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). Aquaculture: Status and prospects. **FAO Aquaculture Newsletter**, n. 37. Disponível em: <<http://www.fao.org/fi>> Acesso em: 15 jan 2008a.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fi>> Acesso em: 15 jan 2008b.

GARCIA, I.; SARABIA, L.; ORTIZ, M. C.; ALDAMA, J. M. Robustness of the extraction step when parallel factor analysis (PARAFAC) is used to quantify sulphonamides in kidney



by high-performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD). **Analyst**, v. 129, p. 766–771, 2004.

GOODMAN & GILMAN. Gilman, G. A.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. **As Bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. 1232 p.

GRÄSLUND, S., HOLMSTRÖM, K., WAHLSTRÖM, A. A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farm. **Marine Pollution Bulletin**, n.46, p.81-90, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, 2ª Revisão, 25p, 2007.

KIM, D. H.; CHOI, J. O.; KIM, J.; LEE, D. W. Application of a polymeric solid phase extraction for the analysis of sulphonamides in milk by LC/MS. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 26, p.1149–1159, 2003.

KISHIDA, K.; NISHINARI, K.; FURUSAWA, N. Liquid chromatographic determination of sulphamonomethoxine, sulphadimethoxine, and their N4-acetyl metabolites in chicken plasma. **Chromatographia**, v. 61, p. 81–84, 2004.

KISHIDA, K.; FURUSAWA, N. Toxic/harmful solvents-free technique for HPLC determination of six sulphonamides in meat. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 26, p. 2931–2939, 2003.

KURZ, M. H. S. Estudo de métodos empregando extração em fase sólida e análise por HPLC-DAD e GC-ECD para a determinação de resíduos de pesticidas em águas e da degradação a campo. **Tese (Doutorado)**, Universidade Federal de Santa Maria, Instituto de Química, 2007.

LYLE-FRITCH, L.P.; ROMERO-BELTRÁN, E.; PÁEZ-OSUNA, F. A survey on use of chemical and biological products for shrimp farming in Sinaloa (NW Mexico). **Aquacultural Engineering**, v. 35, p.103-146, 2006.

MALINTAN, N. T.; MOHD, M. A. Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, p. 154-160, 2006.

MAMANI, M. C. V. Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando a cromatografia líquida de alta eficiência e

eletroforese capilar. **Tese (Doutorado)**, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 2007.

MSAGATI, T. A. M.; NINDI, M. M. Multiresidue determination of sulphonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. **Talanta**, v. 64, p. 87–100, 2004.

MAUDENS, K. E.; ZHANG, G. F.; LAMBERT, W. E. Quantitative analysis of twelve sulphonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography**, v. 1047, p. 85–92, 2004.

PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORONI L.; GALARINI, R. Validation of a Confirmatory Method for the Determination of Sulphonamides in Muscle According to the European Union Regulation 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**. v. 1032, p. 23-29, 2004.

RIBANI, M. Conceitos de validação de métodos cromatográficos aplicados na determinação de Omeprazol e impurezas em cápsulas e comprimidos. **Dissertação (mestrado)**, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 2004.

SALISBURY, C. D. C.; SWEET, J. C.; MUNRO, R. Determination of sulphonamide residues in the tissues of food animals using automated precolumn derivatization and liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of AOAC International**, v. 87, p. 1264–1268, 2004.

SAPKOTA, A.; SAPKOTA, A. R.; KUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER, P.; LAWRENCE, R. Aquaculture Practices and Potencial Human Health Risks: Current Knowledge and future priorities. *Environmental International*. n. 34, p. 1215-1226, 2008.

SKOOG, D.A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Thomson Learning, 2007.

STUBBINGS, G., TARBIN, J., COOPER, A., SHARMAN, M. A multi-residue cation-exchange clean up procedure for basic drugs in produce of animal origin **Analytica Chimica Acta**, v. 547, p. 262-268, 2005.

WANG, S.; ZHANG, H. Y.; WANG, L.; DUAN, Z. J.; KENNEDY, I. Analysis of sulphonamide residue in edible animal products: A review. **Food Additives and**

**Contaminants.** v. 23, p. 362-384, 2006.

## **ANEXOS**