



Ana Filipa Branco Gaspar

Deteção e Quantificação de Resíduos de Antibióticos em Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) Proveniente de Aquacultura

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professor Doutor Fernando Ramos e pela Doutora Andreia Freitas, e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Filipa Branco Gaspar

Deteção e quantificação de resíduos de antibióticos em
Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) proveniente de
aquacultura

Dissertação do Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professor Doutor
Fernando Jorge Ramos e pela Doutora Andreia Freitas apresentada à Faculdade de Farmácia
da Universidade de Coimbra

Setembro 2018



Imagem da capa disponível em:

<https://www.worldfishing.net/news/01/industry-news/export-record-for-norwegian-seafood-in-2010>, acedido em Setembro de 2018.

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para
obtenção do grau de mestre em Segurança Alimentar

O estudo apresentado nesta dissertação foi realizado no Instituto Nacional de
Investigação Agrária e Veterinária (Pólo de Vairão), sob orientação do Professor
Doutor Fernando Jorge Ramos e da Doutora Andreia Freitas.



instituto nacional de
investigação agrária e veterinária

Aos meus pais, Agostinho e Cristina, por caminharem ao meu lado e pelo símbolo de carinho, esforço e dedicação que para mim representam.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação representa a conclusão de mais uma etapa académica marcada pela constante aprendizagem e crescimento a nível pessoal. Esta conquista só foi possível graças ao contributo de várias pessoas, às quais presto aqui o meu reconhecimento e gratidão pela inestimável ajuda.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Doutor Fernando Ramos, pela oportunidade que me concedeu, pela disponibilidade e pelo apoio prestado.

À Doutora Andreia Freitas, pela forma acolhedora e simpática com a qual me recebeu no seu local de trabalho, fazendo-me sentir em casa. Pelo apoio diário na realização do procedimento experimental, pela partilha de conhecimentos e por toda a atenção e paciência demonstrada. A sua ajuda e dedicação foram indispensáveis.

À Doutora Sofia Vila Pouca, pela integração, simpatia e convivência diária no laboratório. Por todo o auxílio prestado no procedimento experimental e pela partilha de conhecimentos. O seu apoio foi também indispensável.

A todas as pessoas com quem me cruzei no laboratório do INIAV, em especial a Salete e a Elsa, pela sua disponibilidade, ajuda, simpatia e bom humor no laboratório.

Aos meus colegas de licenciatura, Diana, Miguel e Ivo, por acreditarem em mim, por me motivarem ano após ano, pela amizade e por partilharem comigo os momentos mais bonitos que Coimbra e a vida académica nos proporcionaram.

Ao Sérgio, meu namorado, por estar presente em todos os momentos e por me apoiar em todas as decisões.

E por último mas não em último, aos meus pais e avó materna, por acreditarem em mim e por muitas vezes deixarem de seguir os seus sonhos para que eu possa seguir os meus. Sem eles o meu percurso académico não teria sido possível. Ser-lhes-ei eternamente grata pela oportunidade que me deram de viver tais momentos.

A todos vós, o meu muito sincero, OBRIGADA.

RESUMO

O crescente aumento da população mundial e as alterações dos hábitos alimentares, levaram a um aumento do consumo de peixe que atualmente ronda um consumo anual de 20kg *per capita*. Em Portugal, o consumo anual de peixe é muito superior à média mundial situando-se nos 56kg *per capita*. Atualmente, e para satisfazer a crescente procura de peixe, a aquacultura é responsável por metade da totalidade de peixe consumido no mundo. O setor representa o crescimento mais rápido das últimas décadas em produção animal para consumo humano e consequentemente, com grande impacto económico a nível mundial. O maior obstáculo deste setor são as doenças bacterianas facilmente propagáveis em meio aquático onde existe um elevado número de animais num espaço reduzido. Para combater este problema, responsáveis por grandes perdas económicas no setor, são administrados antibióticos que, quando utilizados de forma incorreta podem persistir nos tecidos edíveis e causar reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis, ou serem responsáveis pelo aparecimento de resistência bacteriana. As agências reguladoras são responsáveis por estabelecer limites máximos de resíduos para estes compostos. Neste estudo, foram analisadas 39 amostras de salmão (*Salmo salar*) proveniente de aquacultura, recorrendo a metodologias analíticas de UHPLC-ToF-MS e UHPLC-MS/MS para detetar e quantificar a presença de 42 antibióticos pertencentes a 7 classes diferentes. Os métodos analíticos desenvolvidos e otimizados foram validados de acordo com o regulamento 657/2002/CE e verificou-se a inexistência de qualquer um dos compostos pesquisados nas amostras reais.

Palavras-chave: Aquacultura, resíduos de medicamentos veterinários, antibióticos, métodos multiresíduo, UHPLC, MS/MS.

ABSTRACT

The increasing world population and their changes in dietary habits leads to an increase in fish consumption that is currently around an annual consumption of 20kg per capita. In Portugal, annual fish consumption is much higher than the world average being situated at 56kg per capita. Nowadays, aquaculture accounts for half of all fish consumed in the world to satisfy the growing demand for fish. The sector represents the fastest growth of the last decades in animal production for human consumption and consequently, with high economic impact worldwide. The biggest issue in this sector is bacterial diseases easily spreadable in aquatic environments where there is a large number of animals in a small space. To combat this issue, which is responsible for high economic losses in this sector, antibiotics are administered, however when misused, can persist in edible tissues and cause allergic reactions in hypersensitive individuals, or being responsible for the dissemination of bacterial resistance. Regulatory agencies are responsible for establishing maximum residue limits for these compounds. In this study, 39 salmon (*Salmo salar*) samples from aquaculture were analyzed using UHPLC-ToF-MS and UHPLC-MS/MS analytical methodologies to detect and quantify the presence of 42 antibiotics belonging to 7 different classes. The analytical methods developed and optimized were validated according to regulation 657/2002 / EC and the absence of any of the compounds investigated in the real samples was verified.

Keywords: Aquaculture, veterinary drug residues, antibiotics, multi-residue methods, UHPLC, MS/MS.

ÍNDICE

Agradecimentos	4
Resumo	6
Abstract	7
Índice de Tabelas.....	10
Índice de figuras.....	12
Abreviaturas.....	13
1. Objetivo.....	15
2. Revisão Bibliográfica.....	16
2.1. A população e os hábitos alimentares.....	16
2.2. O consumo de pescado em Portugal.....	16
2.3. Benefícios do consumo de pescado	17
2.4. Aquacultura	17
2.5. A utilização de antibióticos em aquacultura.....	18
2.6. Metodologias analíticas	20
3. Legislação.....	23
3.1 Validação	27
3.1.1. Limite de decisão e capacidade de deteção	28
3.1.2. Veracidade	29
3.1.3. Recuperação.....	30
3.1.4. Precisão.....	30
3.1.5 Seletividade/ Especificidade	31
3.1.6. Robustez	31
4. Procedimento experimental.....	32
4.1. Materiais	32
4.2. Reagentes	32
4.3. Padrões.....	32
4.4. Soluções.....	33
4.5. Amostragem	35
4.6. Método de extração	35
4.7. Método de triagem por UHPLC- ToF- MS	36
4.8. Método de confirmação por UHPLC- MS/MS.....	38
4.9. Otimização do detetor de massa MS/MS.....	39
4.10. Procedimento de validação	41
4.10.1. Seletividade/ Especificidade/ Aplicabilidade	42

4.10.2.	Veracidade/ Recuperação.....	42
4.10.3.	Precisão	42
4.10.4.	Capacidade de deteção e Limite de decisão	43
4.10.5.	Curvas de calibração	43
5.	Apresentação e discussão de resultados.....	44
5.1.	Extensão do método	44
5.2.	Extensão de compostos.....	45
5.3.	Otimização do método.....	45
5.4.	Validação	49
5.4.1.	Validação do Método de Triagem	49
5.4.2.	Seletividade/ Especificidade/ Aplicabilidade	51
5.4.3.	Curvas de calibração	52
5.4.4.	Robustez	56
5.4.5.	Recuperação/ Veracidade.....	56
5.4.6.	Precisão	58
5.4.7.	Capacidade de deteção e Limite de decisão	61
6.	Análise de amostras reais	62
7.	Conclusão e perspetivas futuras	64
8.	Referencias Bibliográficas.....	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo das técnicas analíticas mais comumente utilizadas na detecção e quantificação de antibióticos em produtos de aquacultura nos últimos 6 anos.....	23
Tabela 2 - Resumo adaptado da diretiva 96/23/CE do Conselho de 29 de Abril de 1996.....	24
Tabela 3 - Substâncias farmacologicamente ativas e respetivos LMR, adaptado do Regulamento (UE) nº 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009.....	26
Tabela 4 - Classificação dos métodos analíticos e respetivas características de desempenho a verificar.....	27
Tabela 5 - Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas de iões para LC-MS/MS.....	27
Tabela 6 - Veracidade mínima dos métodos quantitativos.....	29
Tabela 7 - Exemplos de CV de reprodutibilidade para métodos quantitativos.....	31
Tabela 8 - Concentração das soluções mãe de cada composto na solução de trabalho mista multiresíduo.....	34
Tabela 9 - Quantidade (µl) de solução de trabalho multiresíduo a adicionar a cada nível de fortificação.....	36
Tabela 10 - Níveis de fortificação das curvas de calibração.....	36
Tabela 11 - Condições de funcionamento do LC.....	37
Tabela 12 - Condições de funcionamento do TOF-MS.....	38
Tabela 13 - Condições de funcionamento do MS/MS.....	39
Tabela 14 - Condições de fragmentação do MS/MS para cada um dos compostos analisados.....	40
Tabela 15 - Níveis de fortificação utilizados para traçar as retas de calibração.....	43
Tabela 16 - Ensaios efetuados e os respetivos estudos de validação.....	43
Tabela 17 - Comparação nutricional entre salmão (<i>Salmo salar</i>) e dourada (<i>Sparus aurata</i>).....	44
Tabela 18 - Resultados da validação do método de triagem.....	50
Tabela 19 - Intensidade da área da Ampicilina obtida no 1 dia nas concentrações 25, 50, 75, 100 e 125 µg/kg.....	53

Tabela 20 - Intensidade da área da Ampicilina obtida no 2 dia nas concentrações 25, 50, 75, 100 e 125 µg/kg.....	54
Tabela 21 - Intensidade da área da Ampicilina obtida no 3 dia nas concentrações 25, 50, 75, 100 e 125 µg/kg.....	55
Tabela 22 - Valores da recuperação obtidos para cada composto.....	57
Tabela 23 - Valores de repetibilidade obtidos para cada composto.....	58
Tabela 24 - Valores de reprodutibilidade obtidos para cada composto.....	60
Tabela 25 - Valores de $CC\beta$ e $CC\alpha$ obtidos para cada composto.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Cromatografia líquida de elevada resolução acoplada a detetor de massa com analisador por tempo de voo.....	37
Figura 2 - Cromatografia líquida de elevada resolução acoplada a detetor de massa sequencial.....	38
Figura 3 - Gráfico comparativo do método de extração com e sem n-hexano.....	45
Figura 4 - Cromatogramas obtidos por UHPLC-ToF-MS para uma mistura de padrões (A), uma amostra branca (B) e para uma amostra branca fortificada (C).....	46
Figura 5 - Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para uma amostra branca (A) e para uma amostra branca fortificada (B).....	47
Figura 6 - Reta de calibração da Ampicilina, com razão das áreas no eixo das ordenadas e a concentração da ampicilina no eixo das abcissas, no dia 1.....	51
Figura 7 - Reta de calibração da Ampicilina, com razão das áreas no eixo das ordenadas e a concentração da ampicilina no eixo das abcissas, no dia 2.....	52
Figura 8 - Reta de calibração da Ampicilina, com razão das áreas no eixo das ordenadas e a concentração da ampicilina no eixo das abcissas, no dia 3.....	54
Figura 9 - Espectro de massa obtido por UHPLC- MS/MS para o composto Ampicilina.....	55
Figura 10 - Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS com as duas transições iónicas de cada composto pela ordem Ampicilina, Ácido Nalidíxico, Sulfapiridina, Trimetoprim, Oxitetraciclina, Tilmicosina e Cefapirina.....	56
Figura 11 - Cromatograma correspondente a uma amostra branca.....	62
Figura 12 - Cromatograma correspondente a uma amostra real contendo os padrões internos.....	62

ABREVIATURAS

ABR - Amostra Branca

AHA - Associação Americana do Coração, do inglês *American Heart Association*

CC α - Limite de decisão

CC β - Limite de detecção

DHA - Ácidos gordos Docosahexaenóicos, do inglês *Docosahexaenoic Acid*

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético, do inglês *Ethylenediaminetetraacetic Acid*

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPA - Ácidos gordos Eicosapentaenóico, do inglês *Eicosapentaenoic Acid*

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

GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

HRMS - Espetrometria de massa de alta resolução, do inglês *High Resolution Mass Spectrometry*

INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

LC - Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LMR - Limite Máximo de Resíduo

MPD - Mistura de Padrões Direta

MRM - Monitorização de reações múltiplas

MS/MS - Espetrometria de massa em tandem

OMS - Organização Mundial de Saúde

PNCR - Plano Nacional de Controlo de Resíduos

ToF - Espetrometria de massa por tempo de voo, do inglês *Time-of-Flight*

UHPLC-ToF-MS - Cromatografia líquida de elevada eficiência acoplada a detetor de massa com analisador por tempo de voo, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled with Time-of-Flight-Mass Spectrometry*

UHPLC-MS/MS - Cromatografia líquida de elevada eficiência acoplada a detetor de massa sequencial, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*

I. OBJETIVO

Os medicamentos veterinários são largamente utilizados nos sistemas de produção intensiva ou, semi-intensiva de animais para consumo humano como a aquacultura. Têm diversas aplicações como terapêuticos, profiláticos ou metafilático. O uso dos mesmos é essencial para garantir a segurança dos consumidores. No entanto, o uso abusivo e o desrespeito pelos intervalos de segurança, pode levar a sérios riscos para a saúde humana uma vez que, os resíduos destes medicamentos podem permanecer nos tecidos edíveis e serem responsáveis por efeitos tóxicos, reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis e resistência bacteriana.

Assim, a análise e controlo de resíduos de medicamentos veterinários é um ponto fulcral para garantir os mais elevados padrões de segurança dos alimentos requeridos na União Europeia.

O principal objetivo deste estudo foi detetar e quantificar a presença de resíduos de 42 antibióticos diferentes, pertencentes a 7 famílias distintas (Tetraciclina, Sulfonamidas, Quinolonas, Penicilinas, Macrólidos, Cefalosporinas e Trimetoprim) em músculo de salmão do atlântico (*Salmo salar*) proveniente de aquacultura, através de métodos de análise por UHPLC (Cromatografia líquida de elevada resolução) acoplado a detetor de massa. Estes métodos são aplicados em análises de rotina do Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCR) no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) e, no âmbito deste trabalho, foi feita a extensão da validação de dois métodos analíticos para a análise de músculo de salmão e para 7 antibióticos que não faziam ainda parte dos métodos de análise validados para as análises de rotina deste laboratório (Ampicilina, Cefapirina, Cefaperazona, Cefalexina, Dicloxacilina, Nafcilina e Oxacilina).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A POPULAÇÃO E OS HÁBITOS ALIMENTARES

A população mundial está a aumentar a um ritmo de 80 milhões de habitantes por ano e estima-se que em 2050 atinja os 9 bilhões de pessoas. Estamos perante um desafio crítico de garantir a alimentação de toda a população, que só será possível através do aumento da produção de alimentos, melhorando a qualidade nutricional dos mesmos e reduzindo o desperdício alimentar ^[1]. A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) prevê que, devem ser produzidos 70% a mais de alimentos para atender às necessidades futuras ^[2]. Consequentemente, o aumento da população e a crescente urbanização, tem influenciado os estilos de vida e os hábitos alimentares que, em comparação com a alimentação menos diversificada das populações rurais, os habitantes da cidade, apresentam uma dieta variada, rica em alimentos de elevada energia, com mais proteína proveniente de carne, peixe e leite e pobre em hidratos de carbono e fibra ^[2, 3]. Face a esta alteração nos hábitos alimentares, ao longo das últimas décadas tem-se verificado um aumento substancial da procura e consumo de pescado a nível mundial. Nos anos 60, o consumo médio anual de peixe não ia para além dos 9,9kg *per capita*, tendo aumentando nos anos 90 para 14,4kg *per capita*. Atualmente, este consumo ronda os 20kg *per capita* ^[4] e representa cerca de 16,6% do consumo total de proteína animal e 6,5% do consumo de toda a proteína disponível para consumo humano ^[5]. No entanto, esta crescente procura de peixe, aumenta a um ritmo muito superior do que aquilo que a disponibilidade de recursos naturais pode suportar. O aumento da poluição marinha, degradação costeira, sobrepesca, juntamente com alterações climáticas e práticas de gestão inadequadas, afetou negativamente os recursos pesqueiros ^[6, 7]. Assim, a aquacultura oferece a única alternativa viável e capaz de suportar o aumento da procura de peixe.

2.2. O CONSUMO DE PESCADO EM PORTUGAL

Portugal é o país da União Europeia com o consumo de peixe mais elevado e o terceiro a nível mundial, ultrapassado apenas pelo Japão e pela Islândia ^[4]. Em média, os portugueses consomem anualmente cerca de 56,8kg de peixe *per capita*, valor este bastante elevado, face ao consumo médio anual do resto do mundo situado nos 20kg *per capita* ^[8,9]. Portugal beneficia de uma localização geográfica ideal para o setor da pesca pois, apresenta uma extensa área costeira (2830km, incluindo os arquipélagos da Madeira e dos Açores) com uma elevada diversidade de espécies e uma Zona Económica Exclusiva (ZEE) de 1700000km² que

representa quase 50% de todas as ZEEs da União Europeia. Assim, a pesca faz parte do património social e cultural do nosso país e particularmente nas zonas costeiras, este setor é um dos principais meios de subsistência uma vez que, as populações dessas zonas dependem quase exclusivamente da pesca ou de atividades relacionadas com a mesma, e a alimentação é baseada sobretudo nos recursos marinhos ^[10]. Os principais peixes consumidos em Portugal são o bacalhau, a pescada e o atum de conserva. Recentemente, também a dourada, o salmão e o robalo surgem entre os mais apreciados pela população portuguesa. Facto este que, demonstra o aumento na frequência do consumo e aceitação de peixe proveniente de aquacultura como parte integrante da dieta dos portugueses. Um destaque particular para o salmão que, não era um peixe tipicamente consumido em Portugal e que hoje está entre os preferidos, sobretudo entre a população mais jovem ^[7].

2.3. BENEFÍCIOS DO CONSUMO DE PESCADO

A qualidade nutricional do peixe, muito superior ao da carne, fazem dele um componente valioso e essencial de uma dieta saudável. O peixe é pobre em gorduras saturadas, hidratos de carbono e colesterol. É uma fonte importante de proteínas de alta qualidade, micronutrientes essenciais (vitaminas A, D, E e do complexo B) e minerais (cálcio, fósforo, ferro, iodo e selénio). É rico em ácidos gordos ómega-3 polinsaturados, particularmente, os ácidos gordos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) ^[3]. Vários estudos epidemiológicos relacionam o consumo de peixe e a prevenção de doenças crónicas como doenças cardiovasculares ^[11, 12], diabetes tipo 2 ^[13] e obesidade ^[14]. Os ácidos gordos EPA e DHA estão assim associados a uma diminuição da morbilidade e mortalidade e têm ainda um papel importante no desenvolvimento fetal bem como no desenvolvimento cognitivo e crescimento fisiológico das crianças ^[15]. Assim, várias organizações de saúde como a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Associação Americana do Coração (AHA), recomendam a ingestão de peixe pelo menos duas vezes por semana.

2.4. AQUACULTURA

Atualmente, a FAO define aquacultura, também designada aquícultura, como o cultivo de organismos aquáticos, marinhos ou de água doce, incluindo peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas, sob condições específicas que, implicam a intervenção humana no processo de criação como o uso de ração controlada, medicação e reprodução para obter uma melhor produção.

A aquacultura está a crescer continuamente em muitas regiões do mundo e a um ritmo muito mais rápido do que qualquer outro setor de produção animal tornando-a numa indústria emergente e conseqüentemente, de grande importância económica [16, 17]. A quantidade total de peixes de aquacultura produzidos para consumo humano, variou de 7% em 1974, 26% em 1994 e 39% em 2004. Em 2014, a aquacultura atingiu um marco importante uma vez que a contribuição deste setor de cultivo para o fornecimento de peixe para consumo humano ultrapassou pela primeira vez o setor da pesca selvagem [4]. Em 2010, a China era a responsável por 70% da produção total a nível mundial e um dos maiores exportadores de produtos de aquacultura [31]. Os maiores produtores de salmão, segundo a FAO, são a Noruega e o Chile e representam 80% da produção total de salmão. A espécie de salmão mais produzida é o salmão do atlântico (*Salmo salar*) que representa 90% da produção total de salmão [32].

A aquacultura pode ser designada extensiva quando envolve o cultivo de pescado num habitat o mais natural possível, sem qualquer suplementação e com o mínimo de impacto sobre o meio ambiente. A criação intensiva, por outro lado, envolve o fornecimento de rações de elevada qualidade e implica um impacto maior sobre o meio ambiente [18].

2.5. A UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS EM AQUACULTURA

Apesar de todas as vantagens da aquacultura, o seu rápido crescimento resultou em algumas preocupações com a qualidade e segurança dos peixes e a saúde dos consumidores. Um dos principais obstáculos no desenvolvimento da aquacultura são as doenças infecciosas que, provocam altas taxas de mortalidade e podem ser responsáveis por grandes perdas, a nível económico, para os produtores [22]. Um sistema de produção intensivo em ambiente aquático por si só, é mais favorável para as bactérias patogénicas do que um ambiente terrestre [23]. Para além disso, neste tipo de sistemas, é frequente existir uma elevada densidade populacional em espaços reduzidos, muitas vezes associados a más práticas de higiene [19]. As condições ambientais desfavoráveis e as práticas de gestão inadequadas, podem afetar significativamente a homeostase e levar ao stress fisiológico dos peixes [20] que, podem interferir com funções como a osmorregulação, reprodução, crescimento ou defesa imunológica e comprometer o bem-estar dos mesmos [21]. Este tipo de situações é propenso à proliferação das doenças bacterianas. Assim, é comum em aquacultura, a utilização de diversos produtos químicos entre os quais desinfetantes, anti-helmínticos e antibióticos. O uso de antibióticos é uma prática comum em medicina veterinária e a sua utilização pode ser terapêutica quando trata uma infeção estabelecida, profilática quando previne a disseminação de doenças entre animais saudáveis, ou metafilática quando visa tratar os animais doentes e simultaneamente previne

que a doença se propague entre os animais são ^[24,18]. Consoante o seu mecanismo de ação, podem ser designados por bactericidas ou bacteriostáticos. Um bactericida mata a bactéria interferindo com a formação da parede celular ou conteúdos celulares. Um bacteriostático impede que as bactérias se multipliquem ao interferir com o metabolismo celular bacteriano ^[24]. As principais vias de administração às quais os produtores recorrem são a via oral através de rações formuladas com o fármaco incorporado ou adicionando diretamente o fármaco na água, designada terapia de imersão. A terapia de imersão é frequente, no entanto, são necessárias quantidades maiores de fármacos para obter os mesmos resultados das rações formuladas ^[25]. Assim, os produtores tendem a optar pelo método mais rentável e económico que é através das rações ^[26]. Em aquacultura, são utilizadas diversas classes de antibióticos como Sulfonamidas, Penicilinas, Quinolonas, Tetraciclina por exemplo, que são também antimicrobianos criticamente ou altamente importantes para a medicina humana. As Quinolonas e Tetraciclina são largamente utilizadas na produção de salmão ^[5, 26]. O recurso à utilização de antibióticos em aquacultura, não é necessariamente um aspeto negativo pois, o grande objetivo é controlar as infeções bacterianas e garantir a qualidade do alimento, quando é ingerido pelo consumidor. No entanto, o uso abusivo e inapropriado destes medicamentos veterinários, desrespeitando os intervalos de segurança, pode trazer sérios riscos para a saúde dos consumidores uma vez que, persistem nos tecidos edíveis e podem ser responsáveis por efeitos tóxicos ou causar reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis. Além disso, a ingestão de alimentos contendo baixas doses e durante longos períodos de tempo, podem resultar no desenvolvimento de resistência bacteriana ^[27]. As propriedades físico-químicas destas substâncias, podem facilitar a sua transferência para águas superficiais e subterrâneas ^[28], já que, entre 70-80% dos antibióticos são eliminados intactos, de volta para o meio ambiente, através das fezes dos peixes por não serem metabolizados pelos mesmos ^[24, 29]. As resistências antimicrobianas são de facto a maior preocupação para a saúde pública. As bactérias são microrganismos bastante versáteis e resistentes que, sobreviveram a diversas alterações ambientais durante a sua existência no planeta ^[30]. O aumento da resistência antimicrobiana causa um aumento das falhas de tratamento e reduz as opções terapêuticas que aumentam a morbidade e mortalidade humana e animal e inflaciona os custos associados à manutenção da saúde pública ^[3, 34]. As quantidades de antibióticos utilizados em aquacultura, dependem de região para região. Por exemplo, em 2003, no Chile para produzir um kg de salmão foram utilizados 0,5kg de antibióticos enquanto na Noruega, para produzir a mesma quantidade, foram utilizados apenas 0,002kg de antibióticos ^[33]. Os países com uma grande atividade aquícola estão sujeitos a um maior controlo e a utilização de antibióticos é apenas para fins

terapêuticos com prescrição de um veterinário. É o caso da Noruega que, desde 1987 tem diminuído a utilização de antibióticos substituindo-os por vacinas eficazes ^[29]. Algumas das estratégias para reduzir a utilização de medicamentos veterinários passam por implementar medidas de higiene e práticas de criação que minimizem o nível de stress dos peixes e garantam a sua sanidade e bem-estar.

2.6. METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Inicialmente a monitorização dos resíduos de antibióticos era frequente na indústria de laticínios dado que estes resíduos comprometiam os processos fermentativos e prejudicavam o negócio ^[35]. Atualmente e dadas todas as questões que se levantam em termos de saúde pública, a sua monitorização é importante para permitir um comércio internacional justo e para proteger os consumidores de possíveis perigos para a saúde ^[36]. Os baixos limites ($\mu\text{g}/\text{kg}$) estabelecidos para estes medicamentos veterinários requerem métodos sensíveis e específicos para determinar inequivocamente a presença de resíduos em matrizes animais.

As matrizes alimentares mais comuns em análises de rotina são músculo, fígado, rins e leite mas, recentemente e atendendo às alterações nos hábitos alimentares dos consumidores, é também comum o controlo em ovos, mel e músculo de peixe.

As metodologias analíticas podem ser classificadas em dois principais grupos: métodos de triagem e métodos de confirmação. Os métodos de triagem são indicados para detetar a presença de um analito ou grupo de analitos no nível de interesse e geralmente fornece resultados qualitativos, semi-quantitativos ou quantitativos. As características ideais de um método de triagem são a simplicidade, o reduzido tempo de análise, a seletividade e sensibilidade, o baixo custo e a elevada produtividade. No entanto, é difícil encontrar num único método todos estes requisitos ^[37]. Dentro das metodologias analíticas utilizadas com maior frequência para deteção de resíduos de antibióticos estão as metodologias microbiológicas, imunoquímicas e físico-químicas.

Os métodos microbiológicos são os mais antigos e baseiam-se na inibição do crescimento bacteriano. Ou seja, após incubação de um microrganismo com indicador de pH, inicia-se o crescimento bacteriano que provocará uma alteração do pH e conseqüentemente alterará a cor do meio. Se estivermos perante a presença de antimicrobianos, essa alteração de cor será retardada ou poderá não ocorrer. Apesar da simplicidade, rapidez do método sem procedimentos de extração e capacidade de detetar baixos níveis de antimicrobianos, o método é pouco específico uma vez que, não é possível identificar o composto ou família de

compostos que inibe o crescimento. Também os microrganismos apresentam diferente sensibilidade a diferentes antimicrobianos, o que faz com que detetem mais facilmente determinados compostos do que outros ^[35].

Os métodos imunoquímicos são baseados na reação entre antigénio e anticorpo que, é uma ligação bastante específica o que torna este método também específico para um determinado composto ou grupo de compostos. O método mais utilizado é o teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) caracterizado por elevada seletividade e sensibilidade. Para além de detetar baixas concentrações de compostos, é possível analisar um elevado número de amostras rápido e facilmente e a baixo custo. A simplicidade e eficácia tornam o método bastante prático, no entanto, a elevada especificidade deste método para determinados compostos ou grupo de compostos, faz com que não seja o método adequado para uma deteção multiresíduos ^[38].

Tanto os métodos microbiológicos como os métodos imunoquímicos são largamente utilizados e têm em comum a sua simplicidade e custos reduzidos, no entanto, a necessidade de métodos confirmatórios adicionais faz com que se opte por outros métodos como os físico-químicos ^[39].

Os métodos físico-químicos têm sido largamente utilizados e desenvolvidos nos últimos anos. Caracterizam-se pela sua elevada sensibilidade e especificidade e permitem uma identificação exata de medicamentos veterinários em produtos de origem animal e um resultado confiável, pelo que são estes que cumprem os requisitos indispensáveis para metodologias de confirmação. Apesar de dispendiosos, possibilitam a análise de um elevado número de compostos num curto espaço de tempo ^[40]. A cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC) são largamente utilizadas em análises de quantificação alimentar. A cromatografia é composta por duas fases, a fase estacionária constituída por uma coluna com propriedades específicas e a fase móvel que pode ser um líquido ou um gás consoante se trate de LC ou GC, respetivamente. A LC tem sido mais utilizada na deteção de antibióticos, pelo facto da maioria dos compostos não ser suficientemente volátil para a GC ^[47].

Os métodos multiresíduo são cada vez mais procurados e adotados em análises de rotina. O principal interesse, nos últimos anos, tem sido melhorar a relação entre o custo e a eficácia das metodologias analíticas e para isso, é necessário desenvolver métodos confiáveis que possibilitem numa única análise, detetar o máximo número de analitos possível. Atualmente, tem-se investido muito em métodos de triagem multiresíduo com tecnologias eficientes que garantam a inexistência de resultados falsos negativos ou falsos positivos. Estes métodos são

baseados essencialmente na tecnologia de LC acoplada a espectrometria de massa em tandem (MS/MS) e espectrometria de massa por tempo de voo (ToF). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) recorre a pressões elevadas para fazer o solvente atravessar a coluna cromatográfica permitindo maior eficiência nas análises. Este sistema é composto por uma bomba, um sistema de injeção, uma coluna cromatográfica e um detetor ^[48].

O uso de tecnologias como UHPLC baseia-se nos mesmos princípios de separação da HPLC mas com algumas diferenças ao nível da coluna cromatográfica que apresenta dimensões reduzidas e as partículas que compõe a fase estacionária são inferiores a 2 μm ^[49]. A UHPLC destaca-se da HPLC pelas vantagens ao nível da sensibilidade, resolução e reduzido tempo de análise que é um aspeto importante quando aplicado a análises de rotina. Este tempo de análise reduzido possibilita ainda a redução do consumo de solventes e consequentemente a redução dos custos ^[25] o que faz com que, seja uma metodologia com uma crescente procura.

O mais comum quando falamos em métodos multiresíduos, é a deteção de compostos pertencentes a uma mesma família de antibióticos ou quimicamente próximos, dada a dificuldade encontrada no procedimento de extração quando numa mesma análise se encontram compostos com diferentes propriedades físico-químicas ^[50]. No entanto nos últimos anos têm surgido diversos estudos onde são analisadas diversas classes de antibióticos num mesmo método ^[51]. Na tabela I estão apresentados alguns exemplos de métodos publicados recentemente que demonstram a crescente utilização de métodos de multi-deteção e multi-classe, com recurso a técnicas de cromatografia acoplada a detetores de massa, para a análise de antibióticos em amostras de peixe.

Tabela I - Resumo das técnicas analíticas mais comumente utilizadas na detecção e quantificação de antibióticos em produtos de aquacultura nos últimos 6 anos.

Classe de Antibióticos	Matriz	Metodologia analítica	Referência
41 Antibióticos de 7 classes (Sulfonamidas, Trimetoprim, Tetraciclina, Macrólidos, Quinolonas, Penicilinas e Cloranfenicol)	Músculo peixe (Dourada)	UHPLC-MS/MS	[17]
8 Antibióticos de 2 classes (Sulfonamidas e Trimetoprim)	Músculo de peixe (Tilápia)	LC-QTOF/MS	[53]
14 Antibióticos (Quinolonas e Tetraciclina)	Músculo de peixe (Tilápia e Truta)	LC-MS/MS	[36]
75 Antibióticos de 6 classes (Penicilinas, Cefalosporinas, Sulfonamidas, Macrólidos, Quinolonas e Anfencóis)	Carne e produtos de aquacultura	LC-MS/MS	[51]
32 Antibióticos de 5 classes (Macrólidos, Penicilinas, Quinolonas, Sulfonamidas e Tetraciclina)	Músculo de peixe (Dourada)	UHPLC – MS/MS	[39]

3. LEGISLAÇÃO

O uso de medicamentos veterinários em sistemas de produção de animais para consumo humano, é essencial para garantir a segurança dos consumidores. Tal como descrito no Livro Branco Sobre a Segurança dos Alimentos ^[41], garantir os mais elevados padrões de segurança dos alimentos na União Europeia constitui uma das principais prioridades políticas da Comissão Europeia. A legislação estabelece regras muito restritas na utilização de medicamentos veterinários quando se trata de produção animal ou derivados destinados ao consumo humano, uma vez que, a presença de resíduos dos mesmos, pode ser resultado de uma utilização ilegal ou abusiva ou desrespeito pelos intervalos de segurança, como foi referido anteriormente. Resíduo de um medicamento veterinário são todas as substâncias farmacologicamente ativas (princípios ativos, excipientes ou produtos de degradação) e os seus metabolitos, que permaneçam em produtos alimentares (tecidos edíveis ou produtos derivados) obtidos a partir de animais aos quais se administrou um medicamento veterinário ^[44].

Assim, a legislação existente deve ser respeitada, para evitar a exposição dos consumidores a concentrações nocivas de resíduos de medicamentos veterinários através das suas dietas. Para cumprir este objetivo, foi implementado um sistema de monitorização e estabelecidos LMRs

(Limite Máximo de Resíduo) para algumas substâncias de uso permitido em medicina veterinária. Os LMRs estão estabelecidos por substância e por matriz e espécie^[42].

A diretiva 96/23/CE do Conselho de 29 de Abril de 1996 que veio substituir as Diretivas 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões 89/187/CEE e 91/664/CEE, descreve a obrigatoriedade do controlo de animais destinados ao consumo humano, bem como de seus produtos derivados, monitorizando a presença de resíduos de medicamentos veterinários antes da autorização para comercialização dos mesmos^[43]. Esta diretiva, divide os compostos mais preocupantes no grupo A e no grupo B. No grupo A, encontram-se as substâncias com efeitos anabolizantes e substâncias não autorizadas (para as quais não existe um LMR estabelecido), como por exemplo, nitrofuranos, cloranfenicol, dimetridazol e metronidazol. No grupo B, encontram-se medicamentos veterinários, incluindo as substâncias não registadas suscetíveis de serem utilizadas para fins veterinários e contaminantes, como por exemplo, corantes, micotoxinas e organofosfatos (Tabela 2). Os antibióticos estão incluídos neste grupo e na sua maioria têm um LMR estabelecido.

Tabela 2 - Resumo adaptado da diretiva 96/23/CE do Conselho de 29 de Abril de 1996.

GRUPO A — Substâncias com efeito anabolizante e substâncias não autorizadas	1. Estilbenos, derivados dos estilbenos, seus sais e ésteres
	2. Agentes antitiroidianos
	3. Esteróides
	4. Lactonas do ácido resorcílico (incluindo o Zeranol)
	5. β -agonistas
	6. Substâncias constantes do anexo IV do Regulamento (CEE) n°2377/90 do Conselho de 26 de Junho 1990
GRUPO B — Medicamentos veterinários e contaminantes	1. Substâncias antibacterianas, incluindo sulfamidas e quinolonas
	2. Outros medicamentos veterinários:
	a) Antelmínticos
	b) Anticocídicos, incluindo os nitroimidazóis
	c) Carbamatos e piretróides
	d) Tranquilizantes
	e) Anti-inflamatórios não esteroidianos (AINE)
	f) Outras substâncias que exerçam atividade farmacológica
	3. Outras substâncias e contaminantes ambientais
	a) Compostos organoclorados, incluindo os PCB
	b) Compostos organofosforados
	c) Elementos químicos
d) Micotoxinas	
e) Corantes	
f) Outros	

O Regulamento (CE) n° 470/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 6 de Maio de 2009, estabelece os LMR de substâncias farmacologicamente ativas nos alimentos de origem animal, que veio substituir o Regulamento (CEE) n° 2377/90 do Conselho e que modifica a Diretiva 2001/82/CE do Parlamento Europeu e do Conselho e o Regulamento (CE) n° 726/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho ^[44]. Neste documento, estão descritas as regras e procedimentos que estabelecem a concentração máxima de um resíduo de uma substância farmacologicamente ativa ou o Limite Máximo de Resíduo, que é permitido em alimentos de origem animal.

Para simplificar a utilização, o Regulamento (UE) n° 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009, apresenta uma lista de todas as substâncias farmacologicamente ativas e respetiva classificação no que respeita aos LMR nos alimentos de origem animal, ordenada alfabeticamente num anexo único ^[45].

Tabela 3 - Substâncias farmacologicamente ativas e respectivos LMR, adaptado do Regulamento (UE) nº 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009.

Substância farmacologicamente ativa	Classe de compostos	LMR estabelecido para produtos de aquacultura	Matriz
Benzilpenicilina (Pen G)	Penicilinas	50 µg/kg	Músculo
Tilmicosina	Macrólidos	50 µg/kg	Músculo
Trimetoprim	Outros	100 µg/kg	Músculo
Ampicilina	Penicilinas	50 µg/kg	Músculo
Cefapirina	Cefalosporinas	Não estabelecido	Músculo
Cefaperazona	Cefalosporinas	Não estabelecido	Músculo
Clorotetraciclina	Tetraciclinas	100 µg/kg	Músculo
Doxiciclina	Tetraciclinas	Não estabelecido	Músculo
Epi-Clorotetraciclina	Tetraciclinas	100 µg/kg	Músculo
Epi-Tetraciclina	Tetraciclinas	100 µg/kg	Músculo
Oxitetraciclina	Tetraciclinas	100 µg/kg	Músculo
Tetraciclina	Tetraciclinas	100 µg/kg	Músculo
Ciprofloxacina	Quinolonas	100 µg/kg	Músculo
Danofloxacina	Quinolonas	100 µg/kg	Músculo
Enrofloxacina	Quinolonas	100 µg/kg	Músculo
Ácido Nalidíxico	Quinolonas	Não estabelecido	Músculo
Norfloxacina	Quinolonas	Não estabelecido	Músculo
Ofloxacina	Quinolonas	Não estabelecido	Músculo
Enoxaxina	Quinolonas	Não estabelecido	Músculo
Cinoxacina	Quinolonas	Não estabelecido	Músculo
Tilosina	Macrólidos	100 µg/kg	Músculo
Sulfacloropiridazina	Sulfonamidas	100 µg/kg	Músculo
Sulfadiazina	Sulfonamidas	100 µg/kg	Músculo
Sulfadimetoxina	Sulfonamidas	100 µg/kg	Músculo
Sulfadimidina	Sulfonamidas	100 µg/kg	Músculo
Sulfametiazol	Sulfonamidas	100 µg/kg	Músculo
Sulfapiridina	Sulfonamidas	100 µg/kg	Músculo
Sulfaquinoxalina	Sulfonamidas	100 µg/kg	Músculo
Sulfatiazol	Sulfonamidas	100 µg/kg	Músculo
Sulfisoxazol	Sulfonamidas	100 µg/kg	Músculo
Sulfametoxazol	Sulfonamidas	100 µg/kg	Músculo
Sulfisomidina	Sulfonamidas	100 µg/kg	Músculo
Sulfadoxina	Sulfonamidas	100 µg/kg	Músculo
Ácido Oxolínico	Quinolonas	100 µg/kg	Músculo
Marbofloxacina	Quinolonas	Não estabelecido	Músculo
Flumequina	Quinolonas	600 µg/kg	Músculo
Espiramicina	Macrólidos	Não estabelecido	Músculo
Cefalexina	Cefalosporinas	200 µg/kg	Músculo
Dicloxacilina	Penicilinas	300 µg/kg	Músculo
Nafcilina	Penicilinas	300 µg/kg	Músculo
Oxacilina	Penicilinas	300 µg/kg	Músculo
Ceftiofur	Cefalosporinas	1 000 µg/kg	Músculo

Na Decisão 2002/657/CE são designados os critérios e parâmetros de desempenho que, devem ser cumpridos para os métodos analíticos utilizados em controlos oficiais dos resíduos de medicamentos veterinários ^[46].

3.1 VALIDAÇÃO

A validação de um método analítico é o processo de avaliação da eficiência desse mesmo método, onde se pretende comprovar que o método é adequado para o seu propósito. Considera-se o método validado e apto para ser utilizado no controlo oficial de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de origem animal, se as características avaliadas estiverem de acordo com os critérios de desempenho estabelecidos na decisão da comissão 2002/657/CE ^[46]. Os métodos analíticos devem ser validados de acordo com os diferentes objetivos de controlo, ou seja, podem classificar-se em métodos qualitativos ou quantitativos e estes serem de triagem ou confirmação. A tabela 4 resume quais as características do desempenho a verificar para os diferentes métodos.

Tabela 4 - Classificação dos métodos analíticos e respetivas características de desempenho a verificar.

		Limite de deteção CC β	Limite de decisão CC α	Veracidade/ Recuperação	Precisão	Seletividade/ Especificidade	Aplicabilidade/ Robustez/ Estabilidade
Métodos qualitativos	Triagem	+	-	-	-	+	+
	Confirmação	+	+	-	-	+	+
Métodos quantitativos	Triagem	+	-	-	+	+	+
	Confirmação	+	+	+	+	+	+

Na deteção por espectrometria de massa, os critérios de desempenho têm por base as variações permitidas nos tempos de retenção relativos e nas razões iónicas de cada substância, calculadas entre ensaios diferentes ^[46]. Os valores das tolerâncias máximas permitidas para as razões iónicas estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas de iões para LC-MS/MS ^[46].

Intensidade Relativa	Tolerância relativa
>50%	±20%
20-50%	±25%
10-20%	±30%
≤10%	±50%

No procedimento de validação, determinam-se os tempos de retenção (TR) de cada composto que pretendemos analisar e os tempos de retenção dos padrões internos, de forma a calcularmos o tempo de retenção relativo (TRR) utilizando a equação 1. Para este parâmetro a variação máxima aceitável é de 2,5%. O desvio da massa exata é calculado através da equação 2 e o critério estabelecido no laboratório é que o erro máximo não deverá ultrapassar 10ppm.

$$TRR = \frac{TR \text{ analito}}{TR \text{ padrão interno}} \quad (\text{equação 1})$$

$$\Delta \text{ ppm} = \frac{\text{Massa exata} - \text{Massa detetada}}{\text{Massa exata}} \times 10^6 \quad (\text{equação 2})$$

No caso de uma amostra onde esteja presente o analito que pretendemos analisar ou no caso de um padrão interno, estas têm de ter uma amplitude sinal/ruído cerca de três vezes superior ao de uma amostra branca.

3.1.1. LIMITE DE DECISÃO E CAPACIDADE DE DETEÇÃO

O limite de decisão (CC_{α}) é o limite a partir do qual podemos declarar uma amostra não conforme com uma probabilidade de erro α ou seja, uma amostra que contém um analito e este ser uma substância proibida, ou, este ser uma substância permitida mas estar em concentração superior ao LMR estabelecido ^[54].

A capacidade de deteção (CC_{β}) é a concentração mais baixa de uma substância que podemos detetar, identificar e/ ou quantificar numa amostra, com uma probabilidade de erro β (5% para todas as substâncias permitidas ou não). No caso de se tratar de uma substância com LMR estabelecido, é a concentração a que o método é capaz de detetar concentrações no limite permitido com certeza estatística de $1 - \beta$ ^[54].

No caso dos métodos de triagem, a avaliação é feita através da transição mais intensa do analito enquanto, nos métodos de confirmação, é feita através do sinal mais crítico (segunda transição) de forma a garantir a identificação inequívoca da presença dos compostos. Os limites CC_{β} e CC_{α} são o resultado de um estudo da variabilidade da resposta analítica pela razão sinal/ruído (S/R) de amostras brancas representativas das amostras laboratoriais de rotina. Para substâncias proibidas ou sem LMR estabelecido, o CC_{α} corresponde a três vezes a média do S/R de 20 amostras brancas, conforme a equação 3.

$$CC\alpha = 3 S/R_{20 \text{ amostras brancas}} \text{ (equação 3)}$$

Após este cálculo, o $CC\beta$ obtém-se fortificando 20 amostras brancas ao nível do $CC\alpha$ determinado. SD é o desvio padrão da reprodutibilidade interlaboratorial das 20 amostras fortificadas, conforme a equação 4.

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times SD_{20 \text{ amostras fortificadas no } CC\alpha} \text{ (equação 4)}$$

Para substâncias permitidas ou com LMR estabelecido, as determinações tem por base o LMR, conforme a equação 5. Ou seja,

$$CC\alpha = C_{LMR} + 1,64 \times SD_{20 \text{ amostras fortificadas no LMR}} \text{ (equação 5)}$$

3.1.2. VERACIDADE

A veracidade é o parâmetro que mede a diferença entre a concentração estimada (com base num valor de referência aceite) de um analito numa amostra analisada e a concentração real do analito na mesma. Para determinar a veracidade devem utilizar-se materiais de referência certificados. Os desvios aceitáveis entre o valor certificado e o determinado experimentalmente são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Veracidade mínima dos métodos quantitativos.

Fração mássica	Intervalo
$\leq 1 \mu\text{g/kg}$	- 50% + 20%
$> 1 \mu\text{g/kg}$ a $10 \mu\text{g/kg}$	- 30% + 10%
$\geq 10 \mu\text{g/kg}$	- 20% + 10%

Quando não está disponível material de referência certificado, procede-se ao cálculo da recuperação.

3.1.3. RECUPERAÇÃO

A recuperação é a percentagem da concentração real de uma substância que foi possível recuperar durante o processo analítico e que se encontra presente no extrato final. A recuperação deve ser determinada para os três níveis de fortificação (1/2 LMR, LMR e 1,5 LMR) e em, pelo menos, seis ensaios paralelos. A recuperação é calculada através da equação 6.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Teor medido}}{\text{Nível de fortificação}} \times 100\% \text{ (equação 6)}$$

3.1.4. PRECISÃO

A precisão é a variabilidade da grandeza medida pela utilização do método em causa e em condições semelhantes (repetibilidade), com modificações de pelo menos um parâmetro (reprodutibilidade) ou em laboratórios diferentes (reprodutibilidade interlaboratorial). Para calcular a repetibilidade, devem realizar-se várias análises em paralelo com pelo menos seis réplicas para cada nível de fortificação 0,5; 1 e 1,5 vezes o LMR. Para a reprodutibilidade, realizam-se as mesmas análises mas, em dias diferentes, num mínimo de três dias, por outro analista, ou com lotes de reagentes diferentes e em diferentes matrizes. Podemos traduzir a repetibilidade e a reprodutibilidade em termos de coeficiente de variação através da equação 7.

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} \text{ (equação 7)}$$

Onde:

σ - Desvio padrão

μ - Média dos resultados

O coeficiente de variação interlaboratorial, em condições de reprodutibilidade, não deve exceder o nível calculado através da equação 8, equação de Horwitz.

$$CV = 2^{(1-0.5\log C)} \text{ (equação 8)}$$

Onde:

C= Fração mássica expressa sob a forma de uma potência de 10

Na tabela 7, são apresentados alguns exemplos de CV de reprodutibilidade para métodos quantitativos.

Tabela 7 - Exemplos de CV de reprodutibilidade para métodos quantitativos.

Fração mássica	CV de reprodutibilidade (%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1000 µg/kg	16

(*) Para concentrações inferiores a 100 µg/kg, a equação de Horwitz apresenta valores de CV demasiado elevados e por isso, abaixo deste nível o CV deverá ser o mais baixo possível.

Em condições de repetibilidade, o CV deve situar-se entre metade e dois terços dos valores referidos a reprodutibilidade.

3.1.5 SELETIVIDADE/ ESPECIFICIDADE

A seletividade/ especificidade de um método consiste na capacidade desse método possibilitar a distinção entre o analito e outras substâncias interferentes como componentes da matriz, metabolitos, substâncias endógenas, isómeros, entre outros compostos, que possam comprometer a capacidade do método identificar o analito. Podemos determinar a seletividade/ especificidade através da análise de 20 amostras brancas usando a metodologia a validar e verificar a presença ou não de interferentes.

3.1.6 ROBUSTEZ

A robustez consiste na determinação de fatores que possam influenciar o desempenho da metodologia e conseqüentemente o resultado tais como o analista, lote e idade de reagentes, solventes, temperaturas, pH's, espécie animal e frescura da amostra, sendo estas alterações nas condições do procedimento, significativas ou não nos resultados obtidos. Pode ser determinada através da análise de 20 amostras sob as diferentes condições referidas e devidamente controladas.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS

O material utilizado neste procedimento experimental, para além do material de vidro utilizado com frequência em laboratório foi, uma trituradora, tubos de centrífuga com capacidade de 15ml, uma balança Mettler Toledo PC200 e AE100 (Greifensee, Suíça), micropipetas de volume variável, uma centrífuga refrigerada Heraeus Megafuge 1.0 (Hanau, Alemanha), agitadores vortex ZX3 Velp Scientifica (Itália) e Heidolph Reax 2 overhead mixer (Schwabach, Alemanha), um Evaporador Turbovap Zymark (Hopkinton, MA, EUA) conectado a um gerador de azoto (pureza 99,9995%) Peak Scientific (Frankfurt, Alemanha), filtros Whatman Mini-Uniprep PVDF (fluoreto de polivinilideno) 0,45µm (Clifton, NJ, EUA).

A coluna cromatográfica foi uma Acquity UPLC HSS T3 1.8µm, 2.1x100mm da marca Waters. O sistema de LC-TOF-MS é composto por UHPLC Shimadzu Nexera X2 composto por bomba binária, injetor automático de volume variável, com sistema de refrigeração e forno para colunas da marca Shimadzu nexera e um detetor TOF-MS, Triple TOFTM 5600⁺, da marca AB Sciex. O detetor MS/MS é um QTRAP 5500⁺ da marca AB Sciex.

4.2. REAGENTES

Durante a análise, foram utilizados unicamente reagentes de grau analítico reconhecido e água ultra pura tipo I. No caso dos solventes utilizados para as fases móveis, apresentavam grau de pureza indicado para HPLC - MS.

Os reagentes utilizados foram o acetonitrilo fornecido por Honeywell (Seelze, Alemanha), metanol fornecido por Carlo Erba (Val de Reuil, França), ácido fórmico fornecido por Chemlab (Zedelgem, Bélgica), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e n-hexano fornecidos por Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha).

4.3. PADRÕES

Os padrões para Tetraciclina, Quinolonas, Macrólidos, Sulfonamidas, Penicilinas, Cefalosporinas e Trimetoprim, foram adquiridos na Sigma- Aldrich. Os padrões internos, fornecidos pela mesma marca, são Desmetiltetraciclina para as Tetraciclina, Lomefloxacina

para as Quinolonas, Roxitromicina para os Macrólidos, Sulfameter para as Sulfonamidas e Trimetoprim e Penicilina V para as Penicilinas e Cefalosporinas.

4.4. SOLUÇÕES

Durante a execução do procedimento extrativo, foi utilizada uma solução de EDTA, que foi preparada através da dissolução de 29,23g de EDTA em água até perfazer 1L. Para a fase móvel A, foi preparada uma solução de ácido fórmico a 0,1%, preparado através da diluição de 1ml de ácido fórmico em água perfazendo o volume de 1L.

A solução mista de padrões internos (10µg/ml) foi preparada através da dissolução de 100µl das soluções mãe dos padrões internos Sulfameter, Roxitromicina, Lomefloxacina, Penicilina V e Desmetiltetraciclina perfazendo o volume de 10ml com metanol.

As soluções mãe foram obtidas através da dissolução de 10 ± 0.5 mg de cada substância padrão em 10ml de metanol, à exceção dos β -lactâmicos (Penicilinas e Cefalosporinas), cuja solução foi preparada em água. A concentração destas soluções mãe de cada um dos padrões foi 1000 µg/ml. Foi preparada uma solução de trabalho multiresíduo com os volumes necessários de cada uma das soluções mãe a analisar, de forma a fortificar as amostras brancas ao nível do CC β e do LMR conforme consta na tabela 8.

Tabela 8 - Concentração das soluções mãe de cada composto na solução de trabalho mista multiresíduo.

Classe de compostos	Analito	Solução Mista (µg/ml)	LMR
Penicilinas	Ampicilina		50
	Benzilpenecilina (Pen G)		
Cefalosporinas	Cefaperazona	2	
	Cefapirina		
Macrólidos	Tilmicosina		
Outros	Trimetoprim		
Tetraciclina	Clorotetraciclina		
	Doxiciclina		
	Epi- Clorotetraciclina		
	Epi- Tetraciclina		
	Oxitetraciclina		
	Tetraciclina		
Quinolonas	Ciprofloxacina		
	Danofloxacina		
	Enrofloxacina		
	Ácido Nalidixico		
	Norfloxacina		
	Ofloxacina		
	Enoxacina		
	Cinoxacina		
Macrólidos	Tilosina	4	100
Sulfonamidas	Sulfacloropiridazina		
	Sulfadiazina		
	Sulfadimetoxina		
	Sulfadimidina		
	Sulfametiazol		
	Sulfapiridina		
	Sulfaquinoxalina		
	Sulfatiazol		
	Sulfisoxazol		
	Sulfametoxazol		
	Sulfisomidina		
	Sulfadoxina		
	Sulfanilamida		
Quinolonas	Marbofloxacina	6	150
	Flumequina		
Macrólidos	Espiramicina	8	200
Cefalosporinas	Cefalexina	(*)	1000
	Ceftiofur		
Quinolonas	Ácido Oxolínico		
Penicilinas	Dicloxacilina	12	300
	Oxacilina		
	Nafcilina		

(*) O Ceftiofur tem um LMR de 1000µg/kg, valor bastante elevado face aos restantes compostos. Por isso, o Ceftiofur não é adicionado à solução de trabalho multiresíduo e é usado em separado.

4.5. AMOSTRAGEM

Foram adquiridas 39 amostras de salmão do atlântico (*Salmo salar*) em diversos hipermercados portugueses, de diversos pontos do país entre Outubro de 2016 e Dezembro de 2018. Estas amostras provenientes de aquacultura eram originárias da Noruega, à exceção de uma delas que tinha origem dinamarquesa. As amostras, ao longo deste trabalho, foram armazenadas a uma temperatura de -70°C.

4.6. MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Para a extração das amostras, foram testados dois procedimentos distintos que consistiram numa extração simples com 10ml de acetonitrilo e 1ml de EDTA validado em 2014 por Andreia Freitas e colegas em músculo de dourada (*Sparus aurata*)^[55], e o outro numa extração simples com 10ml de acetonitrilo, 1ml de EDTA e um passo extra de desengorduramento com n-hexano validado em 2014 por Andreia Freitas e colegas para músculo de bovino^[53].

Foram pesados 2g de amostra de músculo de salmão, previamente homogeneizado, para um tubo de centrífuga de 15ml. Adicionou-se 20µl da solução mista de padrões internos a 10µg/ml a todas as amostras, agitando de seguida no vortex durante 15 segundos e deixando a repousar, ao abrigo da luz, durante 10 minutos. Adicionou-se 10ml de acetonitrilo e 1ml de solução de EDTA a 0,1M e agitou-se no vortex durante 15 segundos e no reax durante 20 minutos. Centrifugou-se a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo. Adicionou-se 2ml de n-hexano e agitou-se no vortex durante 30 segundos e centrifugou-se de novo a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C. De seguida, descartou-se a fase do n-hexano e evaporou-se no Turbovap até cerca de 0,5ml. Na extração sem n-hexano, após transferir o sobrenadante para um novo tubo, as amostras vão diretamente a até cerca de 0,5ml no Turbovap. Adicionou-se 200µl de fase móvel A e agitou-se 15 segundos no vortex. Filtrou-se com Mini uniprepTM 0,45µm, transferiu-se para vials e injetou-se.

Juntamente com as amostras a analisar, deve extrair-se uma amostra em branco (ABR) e duas amostras brancas fortificadas, uma ao nível do CCβ e outra ao nível do LMR conforme descrito na tabela 9. Deve também preparar-se um Mistura de padrão direta (MPD) à qual é adicionada 20µl da solução mista de padrões internos, solução de trabalho ao nível do CCβ e 500µl de fase móvel A.

Tabela 9 - Quantidade (μl) de solução de trabalho multiresíduo a adicionar a cada nível de fortificação.

	Solução de trabalho multiresíduo (μl)
ABF CC β	25
ABF LMR	50
Ceftiofur	10
MPD	25

No método de confirmação, as amostras de confirmação e quantificação deverão ser efetuadas em duplicado e juntamente com estas, deve extrair-se uma amostra em branco, uma curva de calibração composta por cinco amostras brancas fortificadas nos níveis $\frac{1}{2}$ LMR, 1 LMR, 1,5 LMR, 2 LMR e 2,5 LMR, conforme descrito na tabela 10. Deve também preparar-se uma mistura de padrão direta ao nível do LMR, com 20 μl da solução mista de padrões internos e 500 μl de fase móvel A. Os 10 μg de Ceftiofur são adicionado separadamente da solução mista multiresíduos, tal como no método de triagem.

Tabela 10 - Níveis de fortificação das curvas de calibração.

	Concentração	Solução de trabalho (μl)
ABF 1	$\frac{1}{2}$ LMR	25
ABF 2 E MPD	LMR	50
ABF 3	1,5 LMR	75
ABF 4	2 LMR	100
ABF 5	2,5 LMR	125

4.7. MÉTODO DE TRIAGEM POR UHPLC- TOF- MS

Um método de triagem é utilizado para detetar a presença de uma determinada substância numa amostra a um nível pretendido. Este método representa uma estratégia analítica, recorrendo a espectrometria de massa de alta resolução (HRMS), por UHPLC-TOF-MS (cromatografia líquida de elevada resolução acoplada a detetor de massa com analisador por tempo de voo). Uma vantagem destes métodos é a de processarem um elevado número de amostras num curto espaço de tempo e permitirem identificar as amostras potencialmente não conformes. Na figura 1, está representado o aparelho de UHPLC-ToF-MS utilizado para a realização do método de triagem no INIAV.



Figura I - Cromatografia líquida de elevada resolução acoplada a detetor de massa com analisador por tempo de voo.

Na tabela II, estão descritas as condições de funcionamento do sistema LC.

Tabela II - Condições de funcionamento do LC.

Condições de funcionamento do LC			
Fluxo	0,5ml/ Minuto		
Volume de injeção	10µl		
Tempo de corrida	11 Minutos		
Temperatura da coluna	40° C		
Temperatura do amostrador	10° C		
Fases móveis	Fase móvel A - 0,1% de ácido fórmico em água; Fase móvel B - Acetonitrilo		
	Tempo (Minutos)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
	0	97	3
	2	97	3
	5	40	60
	9	0	100
	10	97	3
	11	97	3
Condições do gradiente			

Na tabela 12, estão descritas as condições de funcionamento do ToF-MS.

Tabela 12 - Condições de funcionamento do ToF- MS.

Condições de funcionamento do TOF-MS	
Modo de ionização	Electrospray, modo positivo
Gama de massas (Da)	100-920
Gás cortina (CUR)	25 psig
Gás 1	40 psig
Gás 2	40 psig
Temperatura	450°C
Voltagem	5500

4.8. MÉTODO DE CONFIRMAÇÃO POR UHPLC- MS/MS

Um método de confirmação fornece indicações completas ou complementares para a identificação inequívoca de uma substância. Este método representa uma estratégia analítica para efetuar a confirmação da presença de resíduos de antibióticos e respetiva quantificação, recorrendo a UHPLC-MS/MS (cromatografia líquida de elevada resolução acoplada a detetor de massa sequencial) em músculo de salmão. As condições de funcionamento do LC são as mesmas descritas anteriormente na tabela 11, para o método de triagem.

Na figura 2, está representado o aparelho de UHPLC-MS/MS utilizado para a realização do método de confirmação no INIAV.

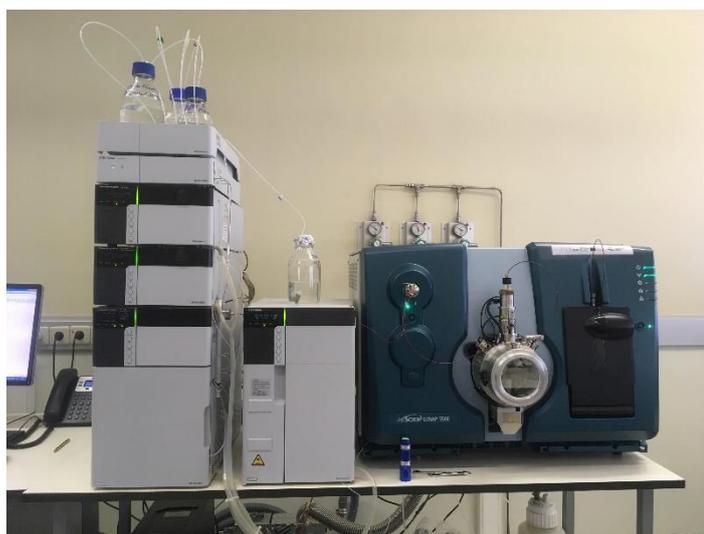


Figura 2 - Cromatografia líquida de elevada resolução acoplada a detetor de massa sequencial.

Na tabela 13, são descritas as condições de funcionamento do MS/MS.

Tabela 13 - Condições de funcionamento do MS/MS.

Condições de funcionamento do MS/MS	
Modo de ionização	Electrospray, modo positivo
Modo de aquisição	MRM
Gás cortina (CUR)	25 psig
Gás 1	40 psig
Gás 2	40 psig
Temperatura	450°C
Voltagem	5500

4.9. OTIMIZAÇÃO DO DETETOR DE MASSA MS/MS

Uma vez que o método já se encontrava otimizado para os 35 compostos pertencentes às análises de rotina do INIAV em diversas matrizes ^[53,55], foi necessário determinar as condições experimentais do detetor de massa MS/MS para os 7 compostos que pretendemos validar. Para tal, realizou-se uma infusão direta das soluções individuais, de cada um dos 7 compostos a 10µg/ml em modo de aquisição automática em ionização positiva (ESI+), de forma a seleccionar as condições de fragmentação dos compostos. A tabela 14 descreve, para cada um dos compostos incluídos no estudo, para os compostos otimizados previamente e para os otimizados no decorrer deste trabalho, o ião precursor e os 2 respetivos fragmentos mais intensos e assim como a energia de colisão correspondente para cada transição iónica (para cada MRM).

Tabela 14 - Condições de fragmentação do MS/MS para cada um dos compostos analisados.

Composto	Ião precursor (m/z) [M + H]⁺	Iões-produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
Ampicilina	350	106	20
		192	20
Cefalexina	348	158	13
		174,1	21
Cefapirina	424,1	152	30
		292	24
Cefaperazona	646	530	15
		143,1	55
Dicloxacilina	470	114,1	47
		160	19
Nafcilina	415,1	171,2	50
		256	34
Oxacilina	402,1	160	20
		243	20
Benzilpenicilina, (Penicilina G)	335	160,1	29
		176	31
Epi-Clorotetraciclina	479	444,1	29
		462	25
Clorotetraciclina	479	444,1	29
		462	25
Doxiciclina	445,1	410,1	35
		428	25
Epi-Tetraciclina	445	410,2	27
		427,2	23
Tetraciclina	445	410,2	27
		427,2	23
Oxitetraciclina	461,1	426	27
		443	19
Danofloxacina	358,3	96,1	21
		314,3	18
Enrofloxacina	360,3	245,2	25
		316,3	20
Ciprofloxacina	332,3	245,1	31
		288,1	23
Flumequina	262,2	202,1	28
		244,2	20
Marbofloxacina	363,3	72,1	20
		320,2	15
Ácido Nalidíxico	233,1	187	33
		215,1	21
Norfloxacina	320,3	233,2	20
		276,2	20
Ácido Oxolínico	262,2	216,1	25
		244,2	20
Cinoxacina	263,2	217,1	23
		245,2	16

Tabela 14 - Condições de fragmentação do MS/MS para cada um dos compostos analisados (Continuação).

Composto	lão precursor (m/z) [M + H]⁺	lões-produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
Ofloxacina	362,1	261,2	20
		318,2	20
Enoxacina	321,2	234,2	20
		303,2	18
Espiramicina	843,4	174,2	45
		540,3	43
Tilmicosina	869,5	174,2	57
		156,1	57
Tilosina A	916,4	174,2	49
		772,4	43
Sulfadimetoxina	311,1	92	39
		156,1	25
Sulfadimidina	279	156,01	25
		186	23
Sulfadoxina	311,4	92,3	20
		156,4	20
Sulfametiazol	271,4	108,1	25
		156,3	20
Sulfametoxazol	254	92	35
		156	21
Sulfanilamida	173	156	9
		92	23
Sulfapiridina	250	92	35
		156	23
Sulfaquinoxalina	301,3	92,2	30
		156,3	20
Sulfatiazol	256	92	35
		156	21
Sulfisomidina	279,4	124,4	20
		186,3	20
Sulfaclopiridazina	285,3	92,3	28
		156,3	18
Sulfadiazina	251,2	92,2	25
		156,2	20
Trimetoprim	291,5	230,3	23
		261,3	25
Ceftiofur	524	241	25
		125	25

4.10. PROCEDIMENTO DE VALIDAÇÃO

Como foi referido anteriormente, a validação do método analítico para deteção e quantificação de antibióticos em músculo de salmão foi efetuada com base nos critérios de validação da decisão da comissão 2002/657/CE ^[46].

Para o procedimento de validação do método de triagem, foram utilizadas 20 amostras brancas e 20 amostras brancas fortificadas ao nível do CC β . No método de triagem verificamos se as amostras brancas eram efetivamente brancas, ou seja, se em cada um das amostras não existia nenhum dos compostos que pretendíamos analisar ou, qualquer outro tipo de interferentes que pudessem comprometer a identificação e quantificação dos analitos pesquisados. Neste método de triagem os critérios avaliados foram o Tempo de Retenção Relativo (TRR) e a massa exata cujo critério estabelecido no laboratório é que o erro máximo não deverá ultrapassar 10ppm.

Os critérios a seguir descritos foram comuns tanto para o método de triagem como para o método de confirmação.

Para a validação do método de confirmação e por forma a diminuir o número de amostras analisadas, combinaram-se experiências para determinar os diferentes parâmetros.

4.10.1 SELETIVIDADE/ ESPECIFICIDADE/ APLICABILIDADE

Para os parâmetros seletividade/especificidade/ aplicabilidade procedeu-se à análise de 20 amostras brancas aplicando o método a validar. Ambos os métodos fazem parte do procedimento de rotina do laboratório, onde são analisadas diversas matrizes animais. Foi feita a extensão para músculo de salmão para comprovar a seletividade/especificidade/aplicabilidade do método.

4.10.2 VERACIDADE/ RECUPERAÇÃO

Estes parâmetros foram analisados apenas no método de confirmação e, uma vez que, neste trabalho não havia disponível material de referência certificado, utilizaram-se os valores obtidos nas três retas de calibração e determinou-se a recuperação. Para o estudo da veracidade/ recuperação, fortificaram-se 6 amostras brancas para cada uma das concentrações $\frac{1}{2}$ LMR, LMR e 1,5 LMR, aplicou-se a metodologia a validar e calculou-se a concentração final para cada amostra. A recuperação foi calculada através da equação 6 e verificou-se se cada um dos antibióticos se encontrava conforme os valores aceitáveis.

4.10.3 PRECISÃO

No estudo da precisão, foram determinadas a repetibilidade e a reprodutibilidade através dos valores obtidos nas três retas de calibração. Fortificaram-se 6 amostras brancas para cada um dos três níveis de concentração ($\frac{1}{2}$ LMR, LMR, 1,5 LMR). Para cada um dos níveis, calculou-

se a concentração média obtida, o desvio padrão e o CV (equação 7). O procedimento foi repetido três vezes, em três dias diferentes e utilizando lotes diferentes de reagentes no procedimento de extração. Os valores obtidos para a repetibilidade e reprodutibilidade foram comparados com os valores aceitáveis conforme a equação de Horwitz (equação 8).

4.10.4 CAPACIDADE DE DETEÇÃO E LIMITE DE DECISÃO

Procedeu-se à análise de 20 amostras brancas fortificadas ao nível do LMR seguindo o procedimento analítico a validar. Calcularam-se as concentrações correspondentes a cada parâmetro através das equações 4 e 5.

4.10.5 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Para traçar as curvas de calibração foram fortificadas amostras brancas com seis níveis de concentração, conforme apresentado na tabela 10. Estes ensaios foram repetidos em três dias diferentes e foram utilizados diferentes lotes de reagentes no procedimento de extração. Na tabela 15, são apresentados os níveis de fortificação utilizados nas curvas de calibração e o respetivo número de réplicas.

Tabela 15 - Níveis de fortificação utilizados para traçar as retas de calibração.

Designação da amostra	Concentrações ao nível do LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Nº de réplicas
ABR	0	1
ABF 1	$\frac{1}{2}$ LMR	6
ABF 2	1 LMR	6
ABF 3	1,5 LMR	6
ABF 4	2 LMR	1
ABF 5	2,5 LMR	1

Como forma de resumo, na tabela 16, estão descritos os diferentes parâmetros analisados, com as concentrações e números de amostras respetivas efetuadas para o procedimento de validação.

Tabela 16 - Ensaios efetuados e os respetivos estudos de validação.

Nº de amostras a analisar	Designação da amostra	Concentrações ao nível do LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Estudo da validação
20	ABR	-	Aplicabilidade
63	ABF	0; $\frac{1}{2}$; 1; 1,5; 2; 2,5	Retas de Calibração/ Robustez
54	ABF	$\frac{1}{2}$; 1; 1,5	Recuperação/ Repetibilidade e Reprodutibilidade
20	ABF	1	CC α CC β

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

O objetivo deste estudo, já referido anteriormente, foi a identificação e quantificação, em simultâneo, de 42 antibióticos pertencentes a 7 classes diferentes (Tetraciclina, Quinolonas, Cefalosporinas, Macrólidos, Penicilinas, Sulfonamidas e Trimetoprim), em amostras de salmão do atlântico (*Salmo salar*) proveniente de aquacultura, através da técnica analítica UHPLC-ToF para triagem e UHPLC-MS/MS para confirmação.

5.1. EXTENSÃO DO MÉTODO

Andreia Freitas e colegas em 2014 ^[55], validaram uma metodologia multiresíduos e multi-classe para determinação de antibióticos em dourada (*Sparus aurata*) através de UHPLC-MS/MS. Para tal, recorreram a uma extração simples com 10ml de acetonitrilo e 1ml de EDTA.

Para fazer a extensão do método da dourada (*Sparus aurata*) para o salmão (*Salmo salar*) foi previamente analisada a comparação nutricional de 100g de cada um dos peixes, conforme a tabela 17.

Tabela 17 - Comparação nutricional entre salmão (*Salmo salar*) e dourada (*Sparus aurata*), adaptado da Plataforma Portuguesa de Informação Alimentar.

Comparação nutricional	Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Salmão (<i>Salmo salar</i>)
Energia (kcal)	167	262
Energia (kJ)	698	1090
Gordura total (g)	9,8	21,9
Ácidos gordos saturados (g)	2,1	4,2
Ácidos gordos monoinsaturados (g)	3,6	10
Ácidos gordos poliinsaturados (g)	2,8	5,1
Ácido linoleico (g)	0,5	0,7
Proteína (g)	19,7	16,2
Água (g)	68,9	60,5
Colesterol (mg)	51	40

Verificamos que, o salmão é um peixe com maior teor de gordura em relação à dourada e por isso, foram testados dois métodos de extração distintos, um deles apenas com acetonitrilo e EDTA e o outro com os mesmos reagentes mas um passo extra de desengorduramento com n-hexano. Este método com n-hexano, foi testado por Andreia Freitas e colegas na deteção e quantificação de antibióticos em músculo de bovino, uma matriz com elevado teor de gordura ^[54]. A figura 3 apresenta os resultados da comparação entre o método de extração

com n-hexano e o método de extração sem n-hexano. No gráfico está representado apenas um composto (Cefalexina, Dicloxacilina, Enrofloxacin, Oxacilina, Espiramicina e Sulfadiazina) de cada uma das famílias analisadas neste trabalho, de forma a sintetizar os resultados.

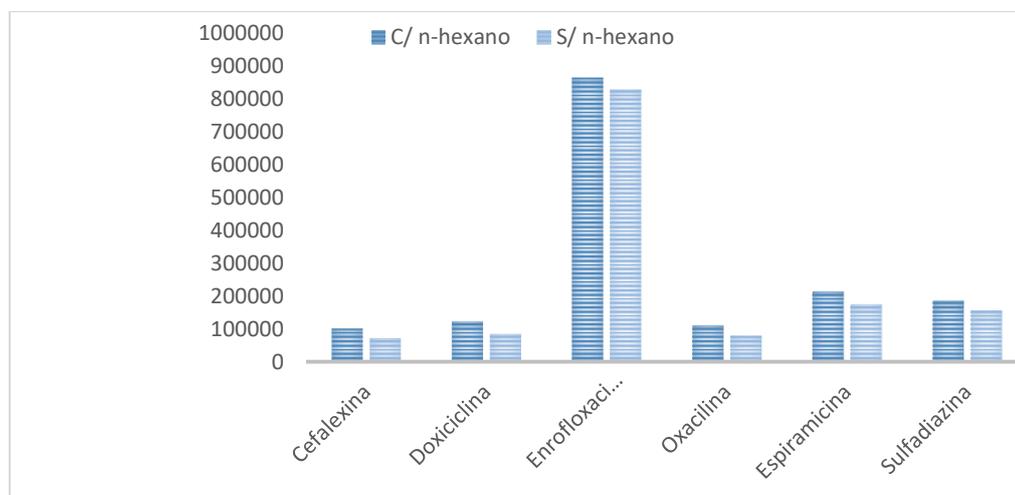


Figura 3 - Gráfico comparativo do método de extração com e sem n-hexano.

Assim, concluímos que o método de extração mais adequado para músculo de salmão é o método com n-hexano por facilitar a identificação dos compostos pesquisados através de uma matriz mais limpa com menos interferentes que possam comprometer a identificação. Por isso, o procedimento de extração neste trabalho incluiu o n-hexano.

5.2. EXTENSÃO DE COMPOSTOS

Para além dos 35 compostos validados anteriormente por Andreia Freitas e colegas em 2014^[55], foram introduzidos e validados neste trabalho, 7 novos compostos dos quais, 4 pertencem à família das Penicilinas (Ampicilina, Dicloxacilina, Nafcilina, Oxacilina) e 3 pertencem ao grupo das Cefalosporinas (Cefapirina, Cefalexina, Cefaperazona). Seguindo o mesmo procedimento de extração e de validação, analisando tanto de amostras brancas como amostras brancas fortificadas, concluímos que a identificação destes compostos era inequívoca e por isso, a validação demonstrou que o método pode ser utilizado também para estes compostos.

5.3. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

No método de confirmação UHPLC-MS/MS foram otimizados os 7 compostos a validar, através de uma infusão direta das soluções individuais de cada um deles a 10µg/ml. O detetor de espectrometria de massa foi do tipo triplo quadrupolo e a fonte de ionização foi do tipo

electrospray em modo positivo ESI (+) por permitir uma ionização das moléculas e fragmentação dos iões precursoros com intensidade suficiente para garantir uma identificação inequívoca, contrariamente ao observado em modo negativo ESI (-) onde não foi possível identificar nenhum dos compostos.

Nas condições cromatográficas anteriormente descritas e otimizadas e aplicando as energias de colisão em ESI (+) foi possível obter os iões precursoros e os iões fragmento para cada composto. A figura 4 representa o espectro de massa que foi possível obter para o composto Ampicilina onde podemos identificar o pico mais intenso correspondente ao ião precursor com 350m/z que deu origem aos dois fragmentos mais intensos nos picos com m/z 106, correspondente ao ião fragmento mais intenso e com m/z 192 correspondente ao segundo ião mais intenso.

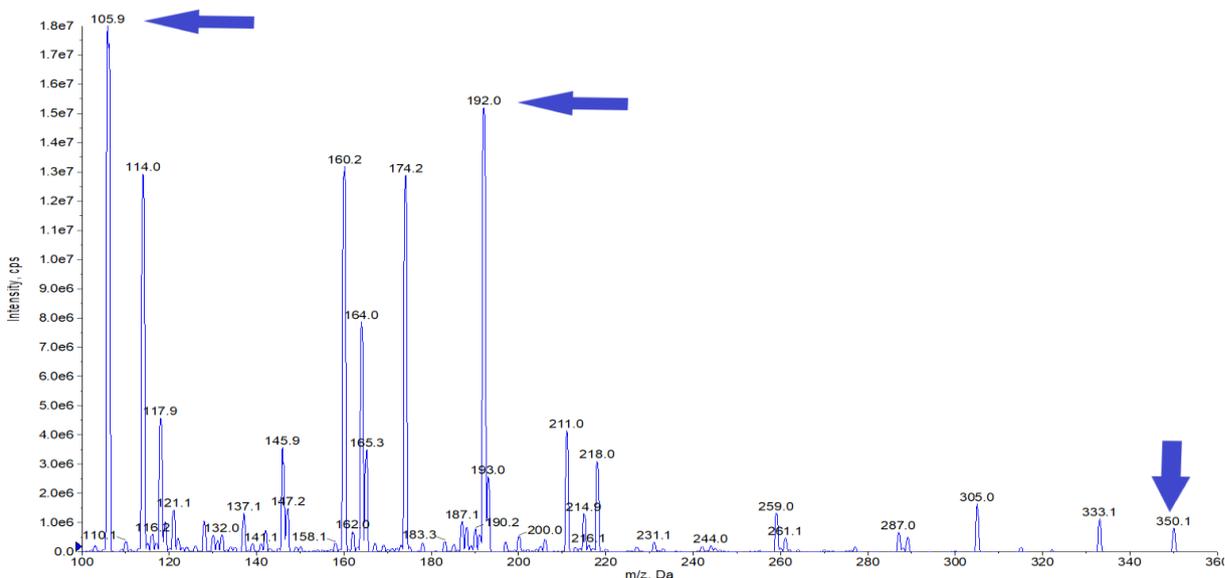
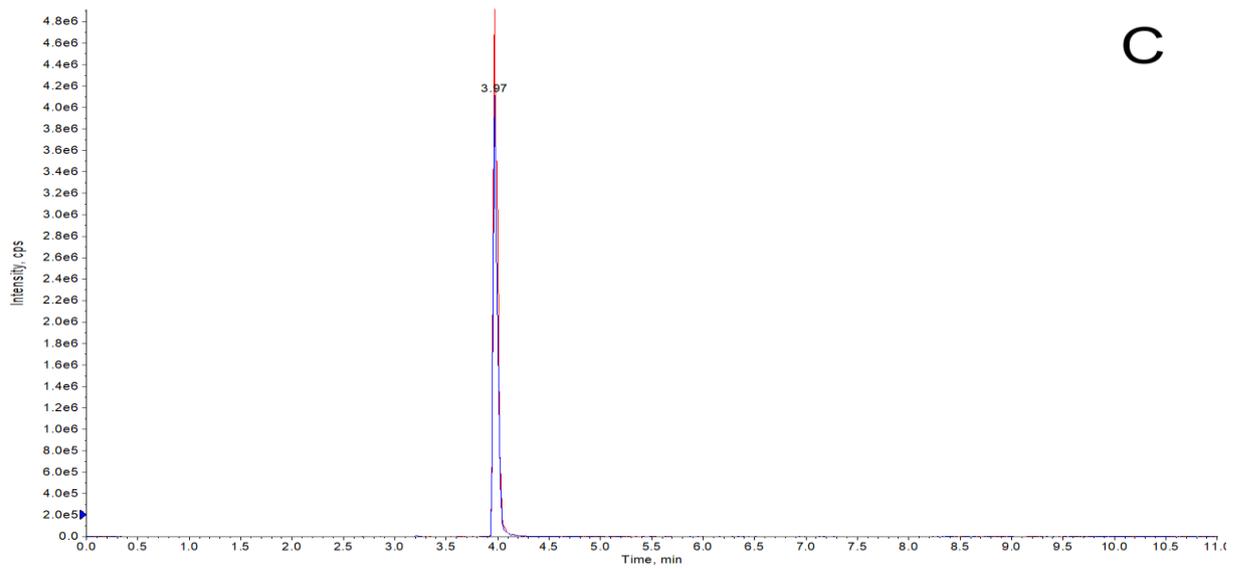
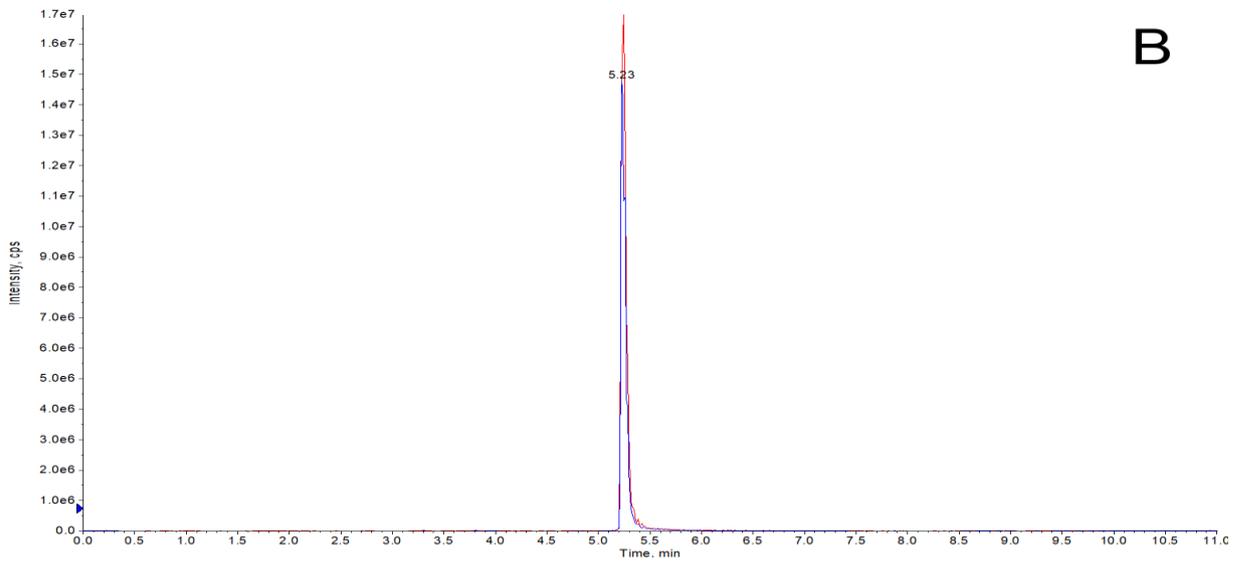
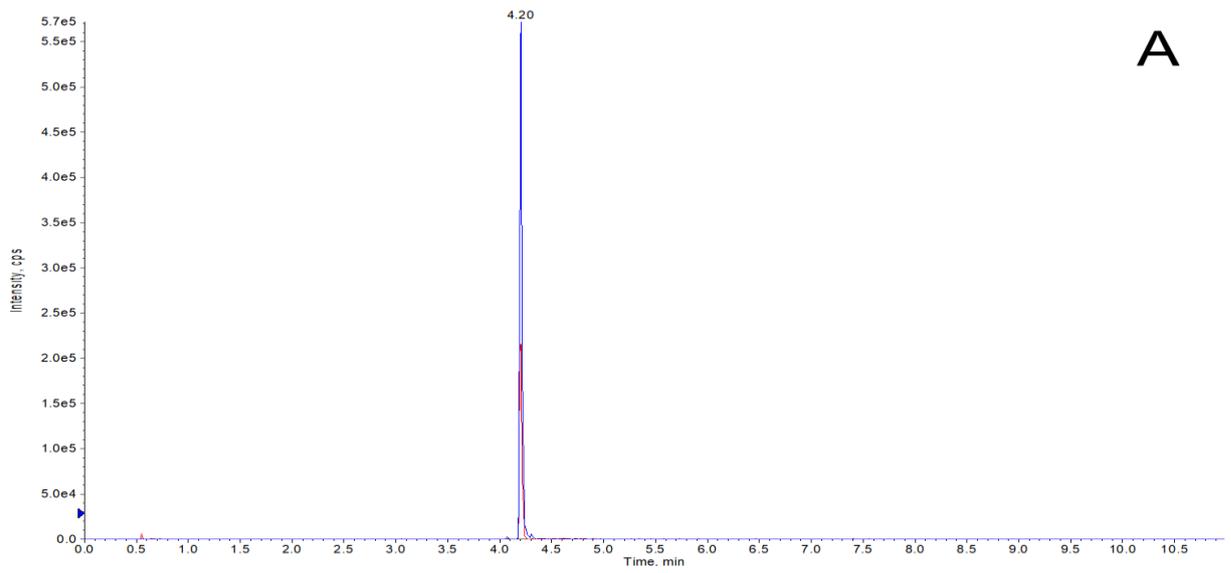
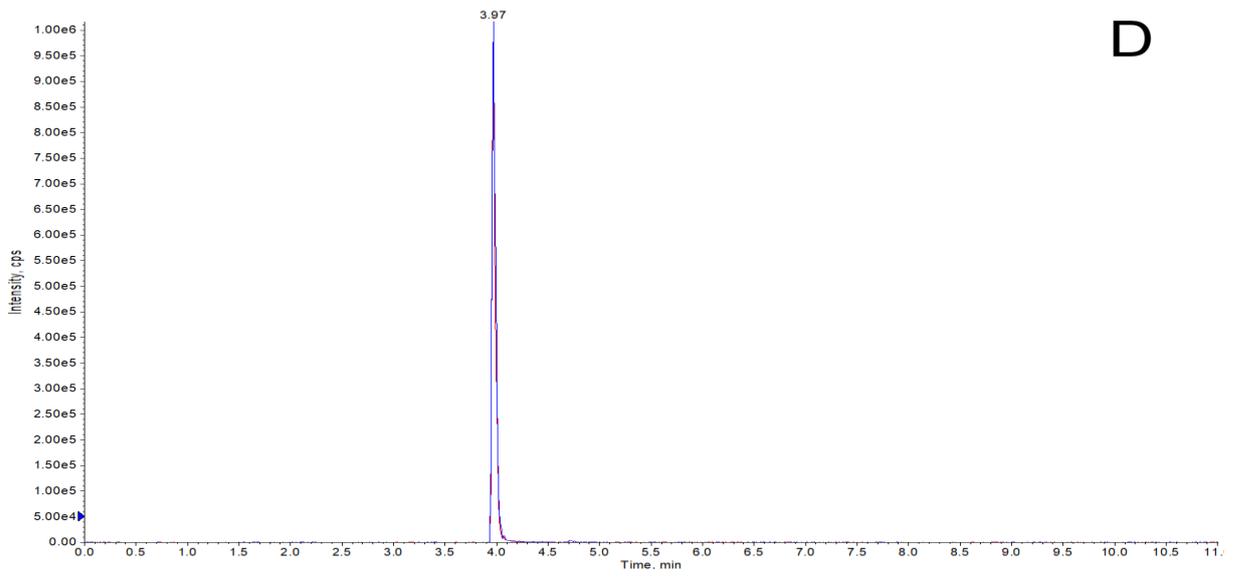


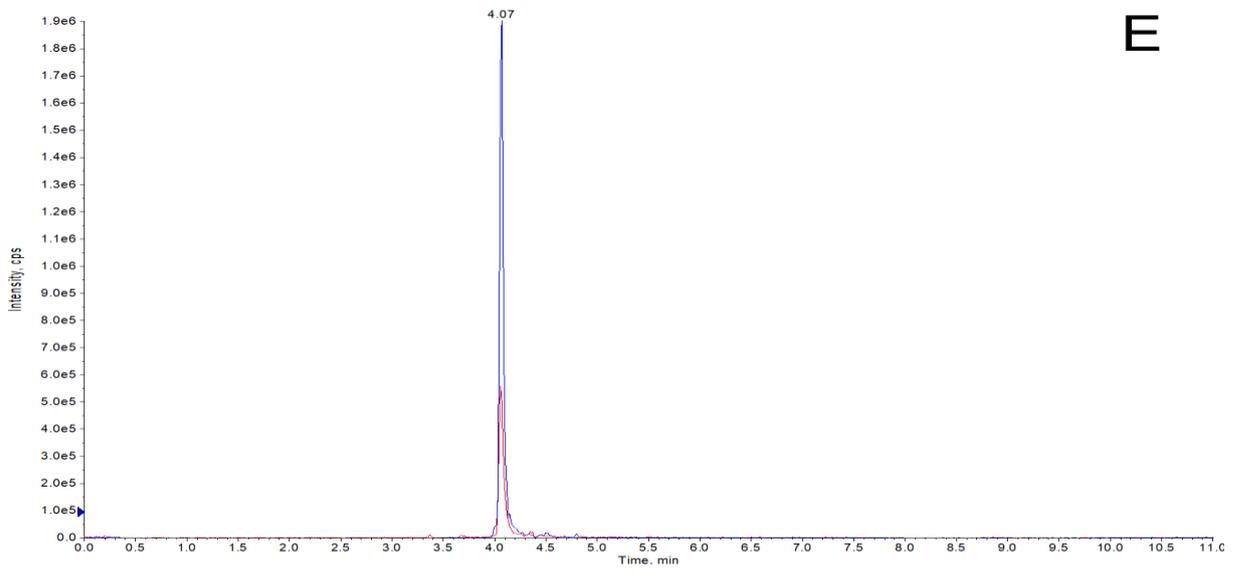
Figura 4 - Espectro de massa obtido por UHPLC- MS/MS para o composto Ampicilina.

A figura 5 apresenta os cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS de uma amostra fortificada, com as duas transições iónicas para um composto de cada uma das 7 famílias analisadas. Os cromatogramas estão identificados por ordem alfabética e correspondem a A - Ampicilina, B - Ácido Nalidíxico, C - Sulfapiridina, D - Trimetoprim, E - Oxitetraciclina, F - Tilmicosina e G - Cefapirina.

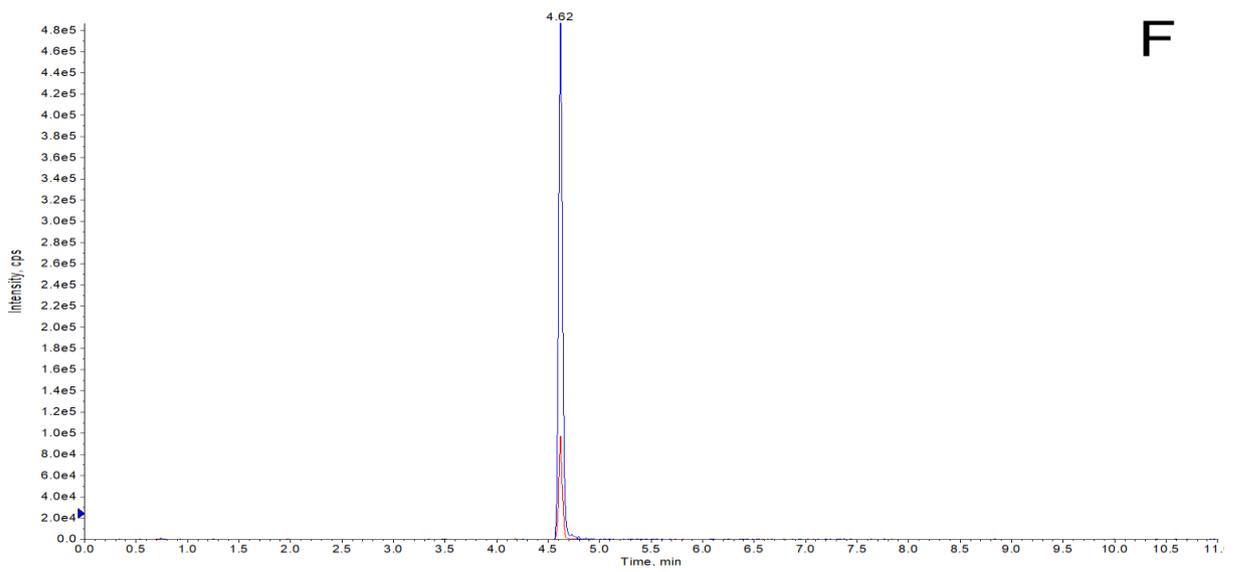




D



E



F

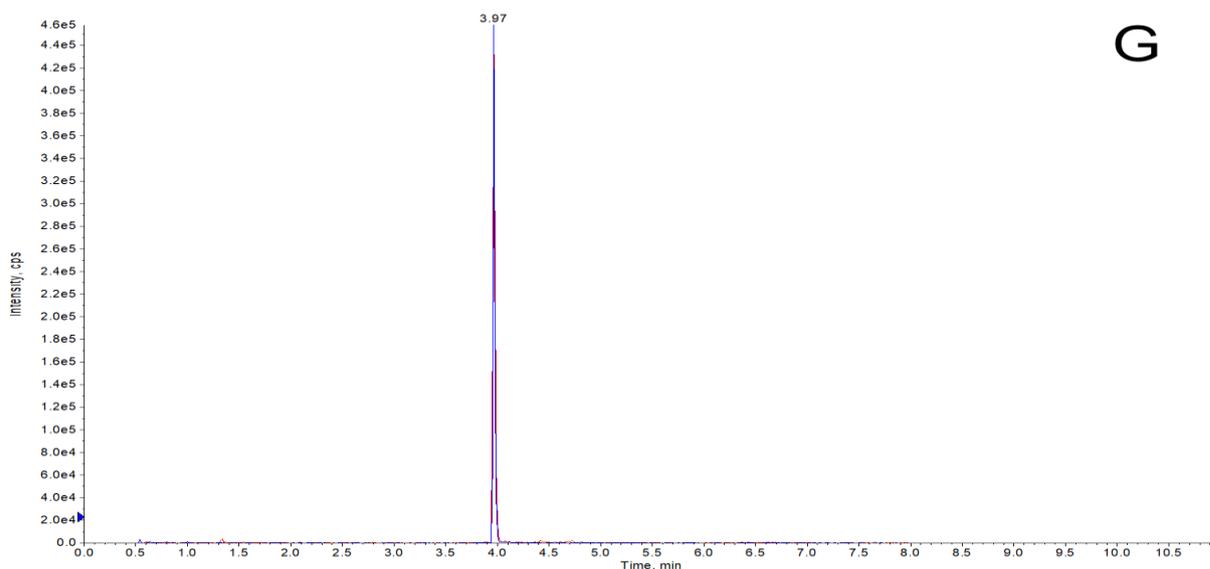


Figura 5 - Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS de uma amostra fortificada, com as duas transições iônicas de cada composto (A - Ampicilina, B - Ácido Nalidíxico, C - Sulfapiridina, D - Trimetoprim, E - Oxitetraciclina, F - Tilmicosina e G - Cefapirina).

5.4. VALIDAÇÃO

O desempenho do método multiresíduo para a identificação e quantificação de 42 antibióticos pertencentes a 7 classes diferentes foi verificado através do estudo de validação baseado nos critérios da Decisão da Comissão 2002/657/CE e os resultados obtidos e a sua interpretação são apresentados de seguida.

5.4.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE TRIAGEM

Tendo em conta que um método de triagem tem que garantir que não ocorrem falsos negativos e que a presença de um composto com concentração próxima do LMR estabelecido, deve ser confirmada com um método de confirmação (neste caso, um método de UHPLC-MS/MS) é prática no INIAV selecionar como CC β a concentração de $\frac{1}{2}$ LMR e proceder à validação por forma a demonstrar a aplicabilidade deste valor.

Para validação do método de triagem, foram analisadas 20 amostras brancas fortificadas ao nível do CC β e nessas amostras, os critérios de identificação foram os TRR e o desvio da massa exata. Os TRR foram calculados através da equação I descrita anteriormente e verificou-se que para as 20 amostras fortificadas, o critério máximo de desvio de 2,5% foi respeitado. Igualmente para o desvio da massa exata cujo máximo aceite é de 10ppm, verificou-

se que também este critério foi cumprido para todas as amostras. Um resumo dos resultados obtidos está apresentado na tabela seguinte.

Tabela 18 - Resultados da validação do método de triagem.

Nome do composto	Fórmula	[M+H] ⁺ (Da)	Tempo de retenção (min)	Tempo de Retenção Relativo (TRR)	Máximo de desvio obtido (%)	Erro máximo (ppm)
Cefalexina	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	348,10192	3,71	0,66	0,1	0,9
Cefapirina	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₆ S ₂	424,06316	3,91	0,70	0	-0,7
Cefaperazona	C ₂₅ H ₂₇ N ₉ O ₈ S ₂	646,14968	4,79	0,86	0	2
Ceftiofur	C ₁₉ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₃	524,03695	4,65	0,83	0,1	0,3
Ampicilina	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	350,1169	4,16	0,74	0	0,5
Dicloxacilina	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₅ S	470,03387	6,2	1,11	0	-1,7
Nafcilina	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₅ S	415,13222	5,97	1,07	0	0,8
Oxacilina	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	402,11182	5,72	1,02	0	0,9
Benzilpenicilina, (Penicilina G)	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	335,10667	3,92	0,7	0,3	0,8
Epi-Clorotetraciclina	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	479,12223	4,15	0,92	0,2	0,2
Clorotetraciclina	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	479,12223	4,3	0,96	0,1	0,4
Doxiciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	445,16121	4,39	0,98	0,2	0,5
Epi-Tetraciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	445,16121	3,96	0,88	0,1	0
Tetraciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	445,16121	3,95	0,88	0,2	0
Oxitetraciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	461,15612	3,84	0,85	0,2	0,4
Danofloxacina	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃	358,15681	3,93	0,91	0,3	0,6
Enrofloxacina	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	360,17246	3,99	0,93	0,2	0,1
Ciprofloxacina	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	332,14116	3,86	0,90	0,2	0,8
Flumequina	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₃	262,08806	5,17	1,20	0,1	0
Marbofloxacina	C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ O ₄	363,14697	3,75	0,87	0,0	0,2
Ácido Nalidixico	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	233,09273	5,1	1,19	0,0	-0,8
Norfloxacina	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	320,14116	3,75	0,87	0,0	0,8
Ácido Oxolínico	C ₁₃ H ₁₁ NO ₅	262,07166	4,69	1,09	0,0	0,6
Cinoxacina	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O ₅	263,06691	4,53	1,05	0,0	-0,8
Ofloxacina	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	362,15172	3,83	0,89	0,2	-0,3
Enoxacina	C ₁₅ H ₁₇ FN ₄ O ₃	321,13641	3,76	0,87	0,2	0,3
Espiramicina	C ₄₃ H ₇₄ N ₂ O ₁₄	843,52195	4,19	0,78	0,0	-0,5
Tilmicosina	C ₄₆ H ₈₀ N ₂ O ₁₃	869,57398	4,45	0,82	0,2	-0,2
Tilosina A	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	916,52709	4,81	0,89	0,2	-0,1
Sulfadimetoxina	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	311,08152	4,8	1,04	0,1	1
Sulfadimidina	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	279,09169	4,11	0,89	0,1	0,7
Sulfadoxina	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	311,08152	4,49	0,98	0,2	-0,9
Sulfametiazol	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂	271,03246	4,05	0,88	0,2	0,9
Sulfametoxazol	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	254,06005	4,47	0,97	0,0	-0,6
Sulfanilamida	C ₆ H ₈ N ₂ O ₂ S	173,03859	1,04	0,23	0,1	-0,9
Sulfapiridina	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	250,06514	3,6	0,78	0,2	-0,9
Sulfaquinoxalina	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	301,07604	4,81	1,05	0,2	0,9
Sulfatiazol	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	256,02156	3,53	0,77	0,4	-0,4
Sulfisomidina	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	279,09169	3,21	0,70	0,3	0,4
Sulfacloropiridazina	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S	285,02142	4,35	0,95	0,2	-0,7
Sulfadiazina	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	251,06039	3,19	0,69	0,4	-0,7
Trimetoprim	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	291,14583	3,73	0,81	0,2	0

5.4.2. SELETIVIDADE/ ESPECIFICIDADE/ APLICABILIDADE

Sendo um método utilizado como rotina neste laboratório e por isso, aplicado a músculo de diversas espécies animais, podemos concluir que o método é também aplicável a músculo de salmão. A análise de 20 amostras brancas, permitiu verificar a inexistência de quaisquer interferentes que pudessem comprometer a identificação dos analitos pesquisados tanto no método de triagem como no método de confirmação. A figura 6 compara os cromatogramas obtidos por UHPLC-ToF-MS para uma mistura de padrões (A), amostra branca fortificada (B) e uma amostra branca (C). A figura 7 compara os cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para uma amostra branca (A) e uma amostra branca fortificada (B).

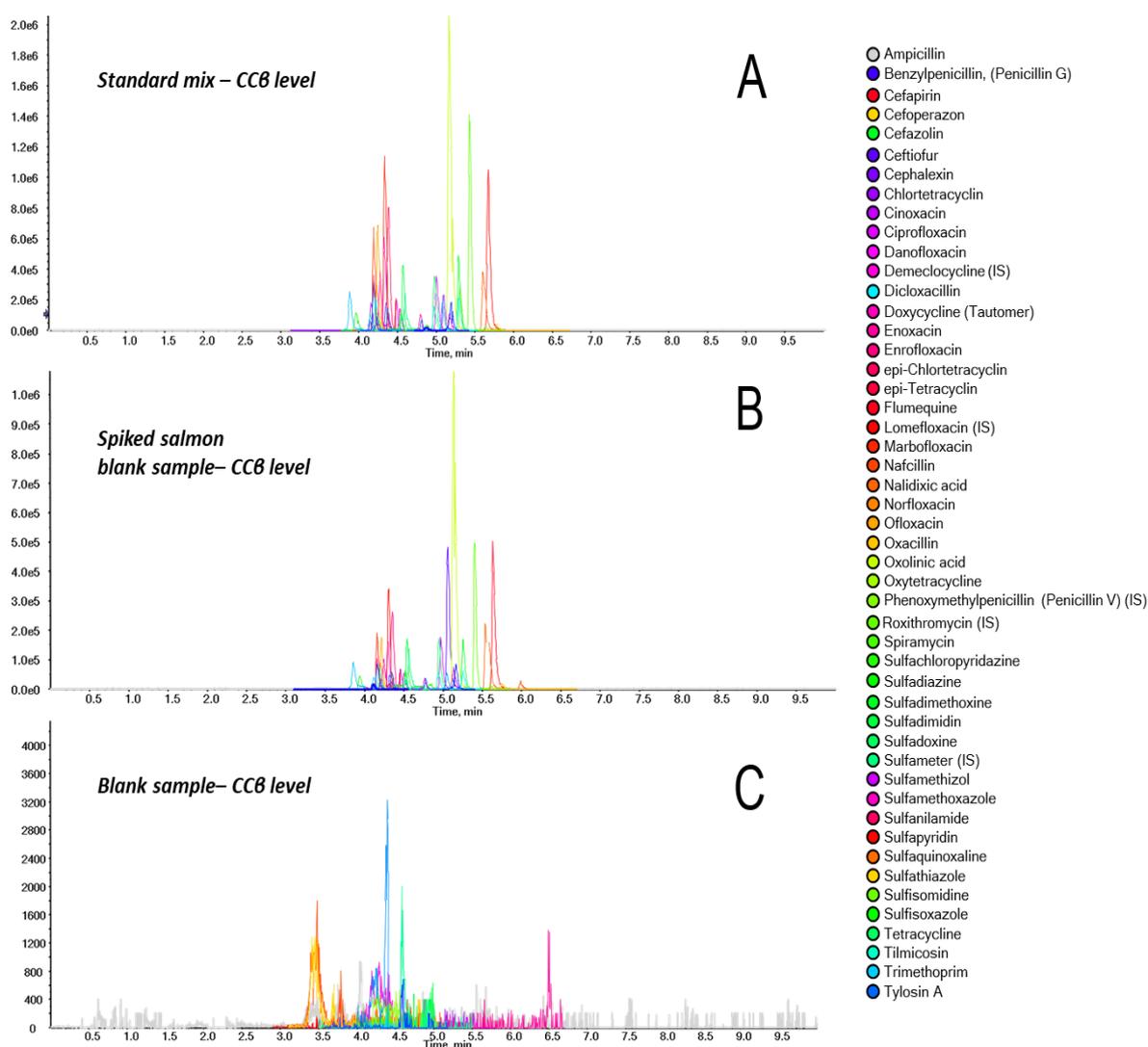


Figura 6 - Cromatogramas obtidos por UHPLC-ToF-MS para uma mistura de padrões (A) amostra branca fortificada (B) e para uma amostra branca (C).

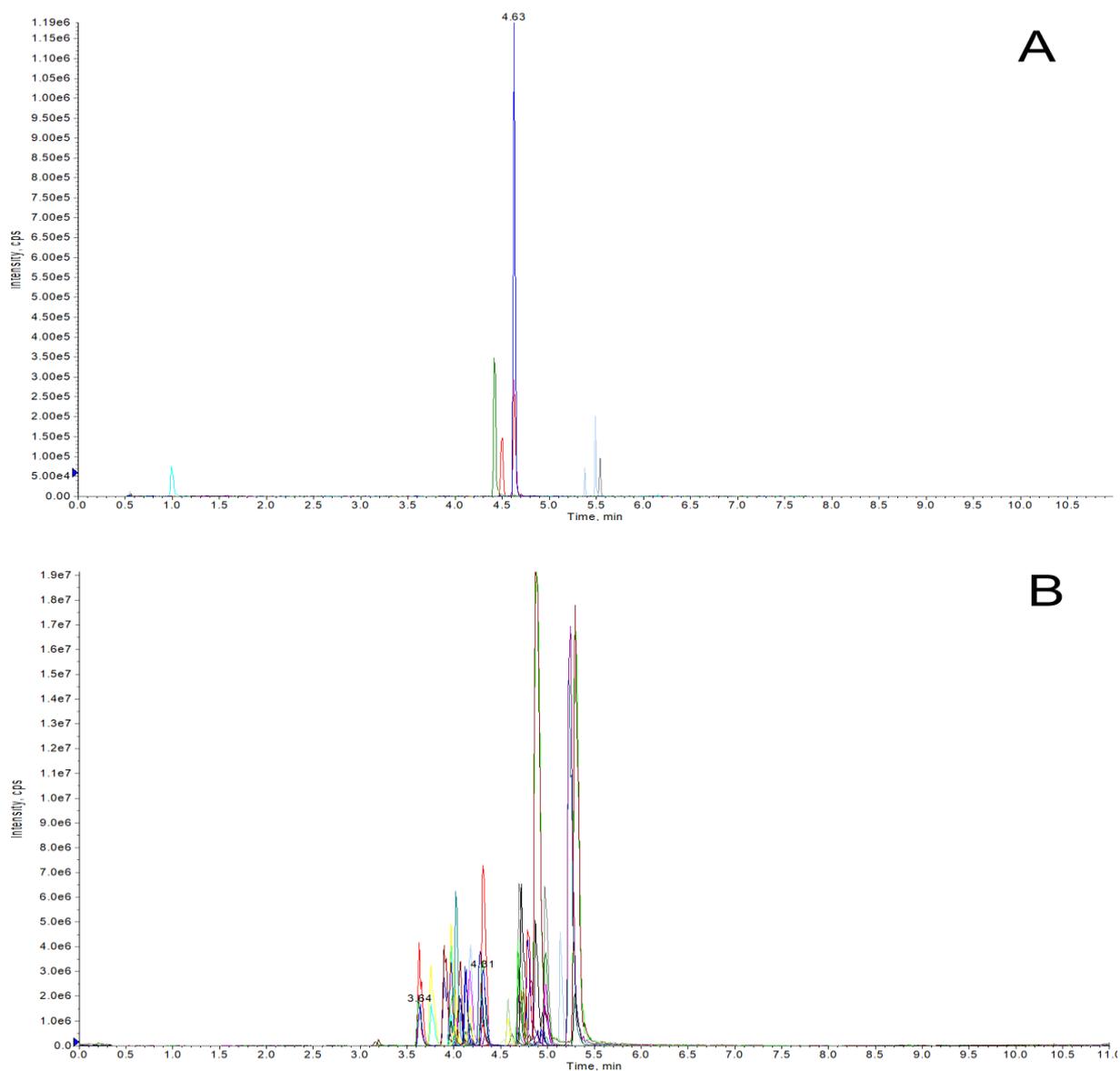


Figura 7 - Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para uma amostra branca (A) e para uma amostra branca fortificada (B).

5.4.3. CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As curvas de calibração, apenas utilizadas no método de UHPLC-MS/MS para confirmação, foram traçadas em triplicado para cada um dos antibióticos a partir da análise de amostras brancas fortificadas em concentrações na faixa do LMR. Ou seja, para a realização das curvas de calibração, as amostras foram fortificadas nas concentrações $\frac{1}{2}$ LMR, LMR, 1,5 LMR, 2 LMR, 2,5 LMR durante três dias distintos para determinar a robustez.

Dado o elevado número de compostos analisados e de forma a simplificar a apresentação dos resultados, foi selecionado um dos compostos validados neste trabalho, a Ampicilina,

pertencente à família das Penicilinas, a título de exemplo. Neste caso, a ampicilina tem um LMR de 50µg/kg e por isso, as amostras foram fortificadas com 0, 25, 50, 75, 100, 125µg/kg e com o padrão interno correspondente, Penicilina V. Para a determinação recorreu-se à área do pico da transição iónica mais intensa e calculou-se a área relativa a partir da razão entre a área do padrão e a do padrão interno conforme descrito nas tabelas 19, 20 e 21 para cada um dos três dias.

O critério de linearidade estabelecido no laboratório é que o coeficiente de correlação linear seja superior a 0,95 ($R^2 > 0,95$), critério que foi observado em todas as moléculas nos três dias de validação. Nas tabelas 19, 20 e 21, estão apresentados os valores da intensidade da área do composto Ampicilina, obtidos em cada um dos três dias e para as concentrações analisadas. As figuras 8, 9 e 10, apresentam a reta de calibração, do mesmo composto (Ampicilina), obtida em cada um dos três dias.

Tabela 19 - Intensidade da área da Ampicilina obtida no dia I, nas concentrações 25, 50, 75, 100 e 125µg/kg.

Concentração	Dia I						Média Y
0,000	0,000						0,000
25,000	12,467	11,649	13,520	13,071	13,126	13,997	31,972
50,000	15,963	14,974	15,133	15,993	17,904	16,691	12,972
75,000	20,933	22,672	20,185	23,156	20,956	21,502	16,110
100,000	25,509						21,568
125,000	31,972						25,509
MEDIA X	62,500						
CORRELAÇÃO	0,9763						
DECLIVE	0,2319						
ORDENADA NA ORIGEM	3,5268						

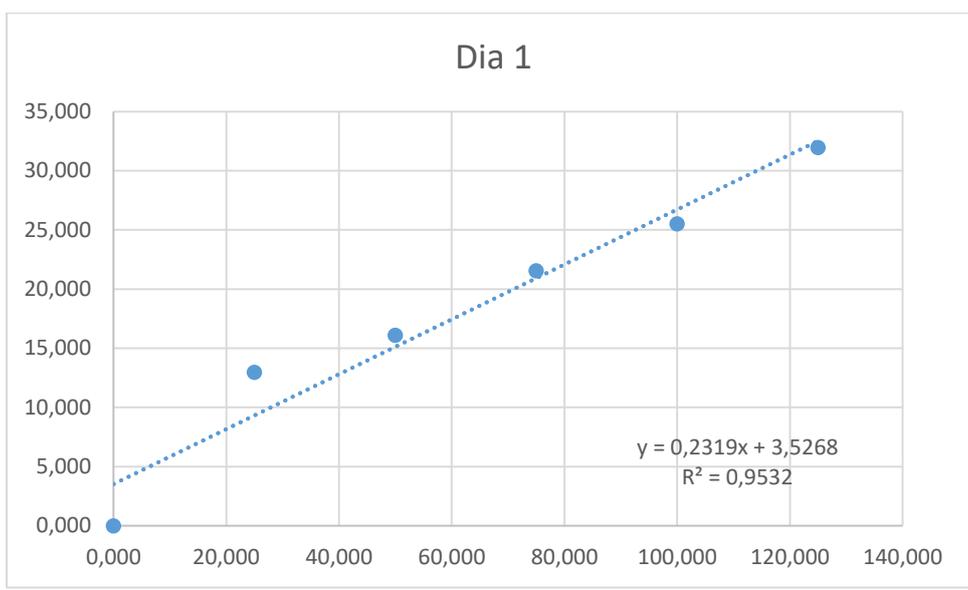


Figura 8 - Retra de calibrao da Ampicilina, com razo das reas no eixo das ordenadas e a concentrao da ampicilina no eixo das abcissas, no dia 1.

Tabela 20 - Intensidade da reaa da Ampicilina obtida no dia 2, nas concentraes 25, 50, 75, 100 e 125µg/kg.

Concentrao	Dia 2						Mdia Y
	0,000	25,000	50,000	75,000	100,000	125,000	
0,000	0,000						0,000
25,000	12,667	12,649	13,120	11,971	12,026	11,997	33,972
50,000	17,072	16,720	16,226	15,132	16,141	18,173	12,405
75,000	19,465	21,712	23,385	21,650	22,562	20,107	16,577
100,000	27,509						21,480
125,000	33,972						27,509

CORRELAO	0,9855
DECLIVE	0,2515
ORDENADA NA ORIGEM	2,9377

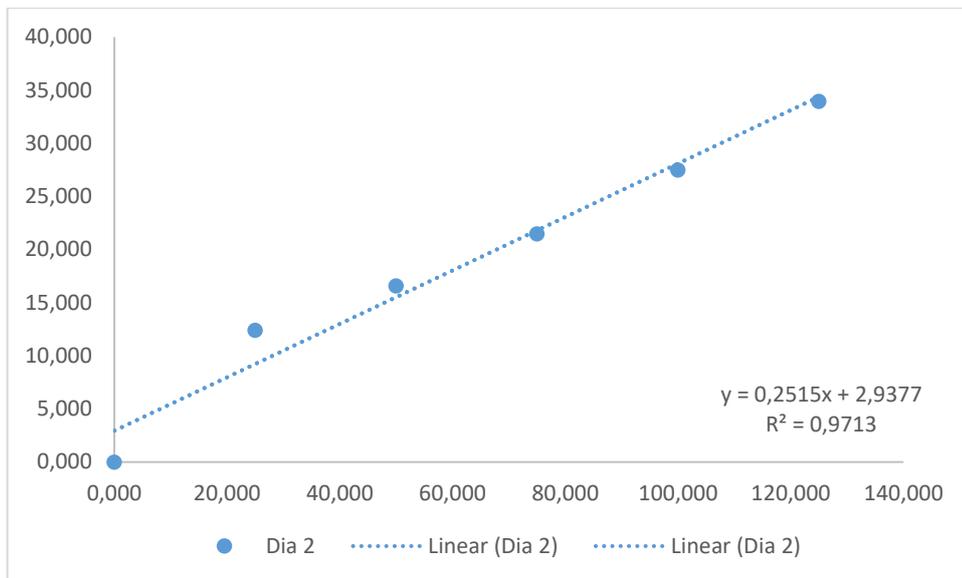


Figura 9 - Retas de calibração da Ampicilina, com razão das áreas no eixo das ordenadas e a concentração da ampicilina no eixo das abcissas, no dia 2.

Tabela 21 - Intensidade da área da Ampicilina obtida no dia 3, nas concentrações 25, 50, 75, 100 e 125µg/kg.

Concentração	Dia 3						Média Y
	0,000	25,000	50,000	75,000	100,000	125,000	
0,000	0,000						0,000
25,000	13,467	12,149	13,126	14,071	13,403	11,017	32,972
50,000	18,324	17,556	15,935	15,288	16,122	17,181	12,872
75,000	21,465	20,712	21,385	21,650	25,062	22,107	16,734
100,000	26,509						22,064
125,000	32,972						26,509

CORRELAÇÃO

0,9797

DECLIVE

0,2413

ORDENADA NA ORIGEM

3,4467

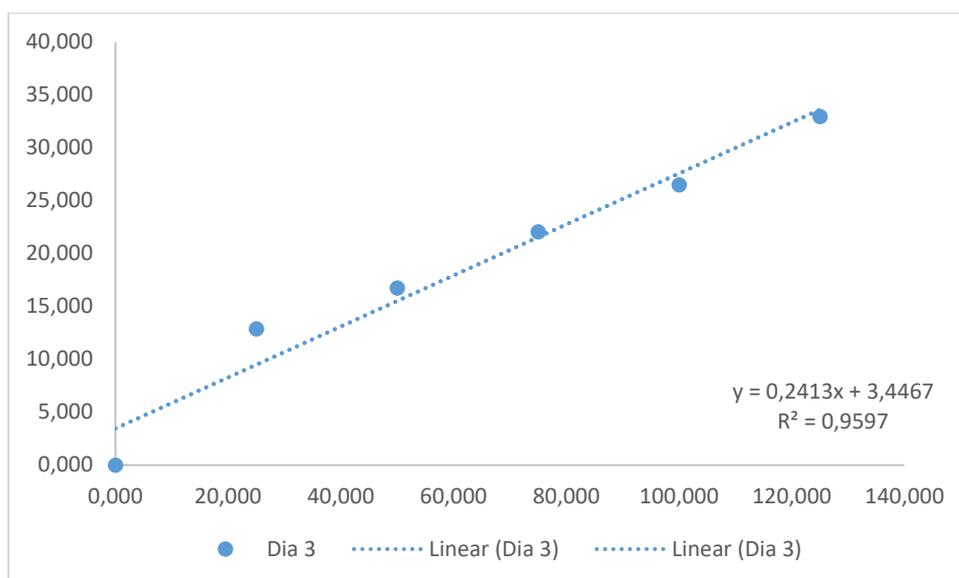


Figura 10 - Reta de calibração da Ampicilina, com razão das áreas no eixo das ordenadas e a concentração da ampicilina no eixo das abcissas, no dia 3.

5.4.4. ROBUSTEZ

Como método de rotina utilizado no INIAV, o método é frequentemente sujeito a pequenas variações que podem afetar o desempenho do mesmo, tais como, a variação de operador, lotes de reagentes diferentes entre outros. Neste trabalho, a variação introduzida, para além de ter sido efetuada uma curva de calibração em três dias diferentes, foram também utilizados diferentes lotes de reagentes. Anteriormente, e para as moléculas já validadas, o laboratório tinha já feito a análise do método com diferentes operadores.

5.4.5. RECUPERAÇÃO/ VERACIDADE

Como foi referido anteriormente, não foi possível determinar a veracidade do método pois, não existiam materiais de referência certificados. Assim, foi calculada a recuperação através da equação 6 com amostras fortificadas em três níveis de concentração $\frac{1}{2}$ LMR, LMR e 1,5 LMR, com seis réplicas para cada nível de fortificação e cada réplica analisada em três dias diferentes. A tabela 22 apresenta os resultados resumidos da recuperação para todos os compostos. Nesta tabela, é possível verificar que para todos os compostos, os limites de aceitação da recuperação compreendidos entre 80% e 110%, são cumpridos sendo o valor mais baixo obtido de 82,79% para a Nafcilina e o mais elevado 106,2% para o Sulfametoxazole.

Tabela 22 - Valores da recuperação obtidos para cada composto.

Composto	Recuperação (%)
Ceftiofur	97,2
Penicilina G	100,8
Tetraciclina	104,3
Epi-Tetraciclina	104,4
Doxiciclina	101,3
Oxitetraciclina	101,5
Clortetraciclina	99,9
Epi-Clortetraciclina	104,3
Tilosina	100,7
Tilmicosina	98,1
Espiramicina	93,2
Marbofloxacina	101,8
Flumequina	106,0
Ácido oxolinico	103,5
Ofloxacina	101,0
Norfloxacina	102,4
Ácido nalidixico	105,5
Enoxacina	98,5
Danofloxacina	99,7
Enrofloxacina	102,2
Ciprofloxacina	101,1
Cinoxacina	101,1
Sulfisoxazole	102,6
Sulfisomidina	103,7
Sulfatiazole	103,2
Sulfaquinoxalina	104,3
Sulfapiridina	102,5
Sulfanilamida	98,8
Sulfametoxazole	106,2
Sulfametizol	102,5
Sulfadoxina	99,7
Sulfadimidina	101,6
Sulfadimetoxina	105,2
Sulfadiazina	100,5
Sulfaclopiridina	101,8
Trimetoprim	105,3
Ampicilina	101,6
Oxacilina	97,88
Nafcilina	82,79
Dicloxacilina	95,87
Cefapirina	99,70
Cefoperazona	93,70
Cefalexina	106,01

5.4.6. PRECISÃO

Para calcular a repetibilidade, procedeu-se à fortificação das amostras brancas em três níveis de fortificação ($\frac{1}{2}$ LMR, LMR e 1,5 LMR) efetuando-se seis réplicas para cada um dos níveis de concentração repetidas em triplicado e durante três dias distintos. Foi calculado o desvio padrão e a média através da curva de calibração. A partir da média foi calculado o CV que não deve ultrapassar $\frac{2}{3}$ do valor obtido pela equação de Horwitz. A tabela 23 apresenta o resumo dos valores de repetibilidade obtidos para cada composto, onde é evidente que a precisão em termos de repetibilidade, para cada um dos compostos, está abaixo do critério de aceitação estabelecido.

Tabela 23 - Valores de repetibilidade obtidos para cada composto.

Composto	Repetibilidade (%)	Critério de aceitação (%)
Benzilpenicilina (Pen G)	15,50	16,75
Tilmicosina	9,18	16,75
Trimetoprim	12,50	15,09
Ampicilina	7,48	16,75
Cefapirina	14,30	16,75
Cefaperazona	14,30	16,75
Clorotetraciclina	2,83	15,09
Doxiciclina	11,17	15,09
Epi-Clorotetraciclina	12,40	15,09
Epi-Tetraciclina	4,39	15,09
Oxitetraciclina	5,78	15,09
Tetraciclina	4,03	15,09
Ciprofloxacina	12,30	15,09
Danofloxacina	12,82	15,09
Enrofloxacina	8,32	15,09
Ácido Nalidíxico	13,69	15,09
Norfloxacina	5,53	15,09
Ofloxacina	3,54	15,09
Enoxaxina	4,52	15,09
Cinoxacina	15,02	15,09
Tilosina	9,85	15,09
Sulfacloropiridazina	6,92	15,09
Sulfadiazina	5,46	15,09
Sulfadimetoxina	13,61	15,09
Sulfadimidina	13,11	15,09
Sulfametiazol	7,67	15,09
Sulfapiridina	9,94	15,09
Sulfaquinoxalina	14,45	15,09
Sulfatiazol	14,71	15,09
Sulfisoxazol	12,71	15,09
Sulfametoxazol	9,12	15,09
Sulfisomidina	13,11	15,09

Tabela 23 - Valores de repetibilidade obtidos para cada composto (Continuação).

Composto	Repetibilidade (%)	Critério de aceitação (%)
Sulfadoxina	5,26	15,09
Ácido Oxolínico	11,84	15,09
Marbofloxacina	5,27	14,19
Espiramicina	7,54	13,59
Cefalexina	7,17	13,59
Flumequina	14,35	11,52
Oxacilina	8,56	12,79
Dicloxacilina	10,22	12,79
Nafcilina	7,88	12,79
Ceftiofur	10,0	10,67

Para calcular a reprodutibilidade, procedeu-se à fortificação das amostras brancas em três níveis de fortificação ($\frac{1}{2}$ LMR, LMR e 1,5 LMR) efetuando-se seis réplicas para cada um dos níveis de concentração repetidas em triplicado e durante três dias distintos. Foi calculado o desvio padrão, a média e o CV para cada nível de concentração. O CV não deverá ultrapassar o valor obtido pela equação de Horwitz. A tabela 24 apresenta o resumo dos valores de reprodutibilidade obtidos para cada composto, podendo de igual modo, verificar-se a conformidade dos resultados obtidos por comparação com os critérios de aceitação.

Tabela 24 - Valores de reprodutibilidade obtidos para cada composto.

Composto	Reprodutibilidade (%)	Critério de aceitação (%)
Benzilpenicilina (Pen G)	23,30	25,12
Tilmicosina	12,96	25,12
Trimetoprim	18,75	22,63
Ampicilina	7,47	25,12
Cefapirina	21,60	25,12
Cefaperazona	21,50	25,12
Clorotetraciclina	4,25	22,63
Doxiciclina	16,77	22,63
Epi-Clorotetraciclina	18,60	22,63
Epi-Tetraciclina	6,58	22,63
Oxitetraciclina	8,67	22,63
Tetraciclina	6,04	22,63
Ciprofloxacina	18,45	22,63
Danofloxacina	21,07	22,63
Enrofloxacina	12,48	22,63
Ácido Nalidíxico	20,54	22,63
Norfloxacina	8,29	22,63
Ofloxacina	5,31	22,63
Enoxaxina	6,79	22,63
Cinoxacina	21,52	22,63
Tilosina	10,48	22,63
Sulfacloropiridazina	10,38	22,63
Sulfadiazina	8,18	22,63
Sulfadimetoxina	22,41	22,63
Sulfadimidina	17,67	22,63
Sulfametiazol	11,50	22,63
Sulfapiridina	14,91	22,63
Sulfaquinoxalina	16,18	22,63
Sulfatiazol	22,06	22,63
Sulfisoxazol	19,07	22,63
Sulfametoxazol	13,68	22,63
Sulfisomidina	19,67	22,63
Sulfadoxina	7,88	22,63
Ácido Oxolínico	17,75	22,63
Marbofloxacina	7,90	21,29
Espiramicina	8,98	20,39
Cefalexina	6,74	20,39
Flumequina	16,52	17,28
Oxacilina	12,84	19,18
Dicloxacilina	18,55	19,18
Nafcilina	11,83	19,18
Ceftiofur	12,1	16,00

5.4.7. CAPACIDADE DE DETEÇÃO E LIMITE DE DECISÃO

Os $CC\beta$ e $CC\alpha$, determinados para o método de confirmação, foram determinados pela análise de amostras brancas fortificadas ao nível do LMR. Tanto o $CC\alpha$ como o $CC\beta$, foram calculados para cada um dos três dias das curvas de calibração. Através da concentração ao nível do LMR e do desvio padrão, foram aplicadas as equações 4 e 5. A tabela 25 apresenta os resultados obtidos para cada composto.

Tabela 25 - Valores de $CC\beta$ e $CC\alpha$ obtidos para cada composto.

Composto	$CC\beta$	$CC\alpha$
Benzilpenicilina (Pen G)	81,37	65,69
Tilmicosina	68,89	59,44
Trimetoprim	130,28	115,14
Ampicilina	79,74	64,87
Cefapirina	1,05	0,73
Cefaperazona	0,56	0,42
Clorotetraciclina	148,44	124,22
Doxiciclina	13,22	7,76
Epi-Clorotetraciclina	146,69	121,67
Epi-Tetraciclina	145,46	122,31
Oxitetraciclina	134,36	117,18
Tetraciclina	133,06	116,53
Ciprofloxacina	110,19	105,09
Danofloxacina	116,52	108,26
Enrofloxacina	112,24	106,12
Ácido Nalidíxico	17,86	10,48
Norfloxacina	4,05	2,38
Ofloxacina	8,62	5,06
Enoxaxina	6,38	3,75
Cinoxacina	9,80	5,75
Tilosina	128,08	114,04
Sulfacloropiridazina	153,71	126,85
Sulfadiazina	130,83	115,42
Sulfadimetoxina	121,22	110,61
Sulfadimidina	127,18	112,31
Sulfametiazol	132,97	116,48
Sulfapiridina	121,21	110,61
Sulfaquinoxalina	130,68	115,34
Sulfatiazol	133,75	116,87
Sulfisoxazol	129,42	114,71
Sulfametoxazol	129,42	114,71
Sulfisomidina	128,40	114,20
Sulfadoxina	129,84	114,92
Ácido Oxolínico	123,14	111,57
Marbofloxacina	7,65	4,49

Tabela 25 - Valores de $CC\beta$ e $CC\alpha$ obtidos para cada composto (Continuação).

Composto	$CC\beta$	$CC\alpha$
Espiramicina	21,11	12,39
Cefalexina	515,45	89,07
Flumequina	657,72	628,86
Oxacilina	413,55	356,78
Dicloxacilina	380,71	364,08
Nafcilina	403,86	351,93
Ceftiofur	2085,8	1366,5

6. ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS

As 39 amostras de salmão (*Salmo salar*) provenientes de aquacultura da Noruega e Dinamarca, adquiridas entre Outubro de 2016 e Dezembro de 2018, foram analisadas pelo método de triagem UHPLC-ToF-MS. Com esta metodologia de análise, caso algum composto estivesse presente, poderíamos ter uma semi-quantificação numa gama de concentrações entre o $CC\beta$ e o LMR. Ao analisar as amostras, verificamos que em nenhuma delas estavam presentes os compostos analisados e por esse motivo, nenhuma delas foi submetida ao método de confirmação. Nas figuras 11 e 12 encontram-se os cromatogramas correspondentes a uma amostra branca e uma amostra real, respetivamente, na qual é possível detetar apenas os padrões internos. Apesar de nenhuma das amostras reais conter os compostos pesquisados, podemos comprovar a eficácia do método pela deteção dos padrões internos.

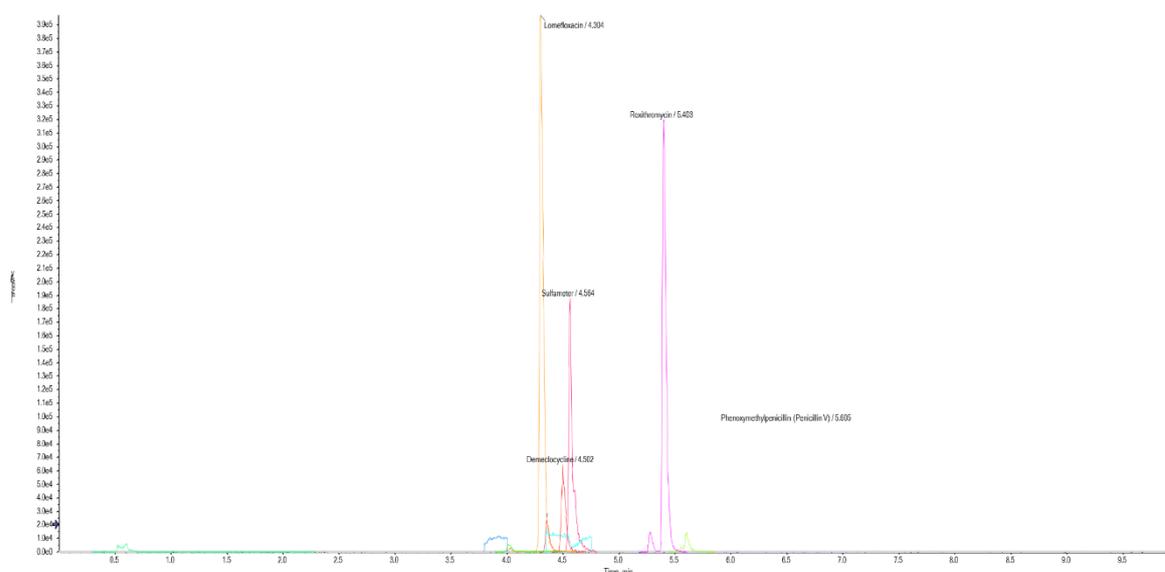


Figura 11 - Cromatograma correspondente a uma amostra branca.

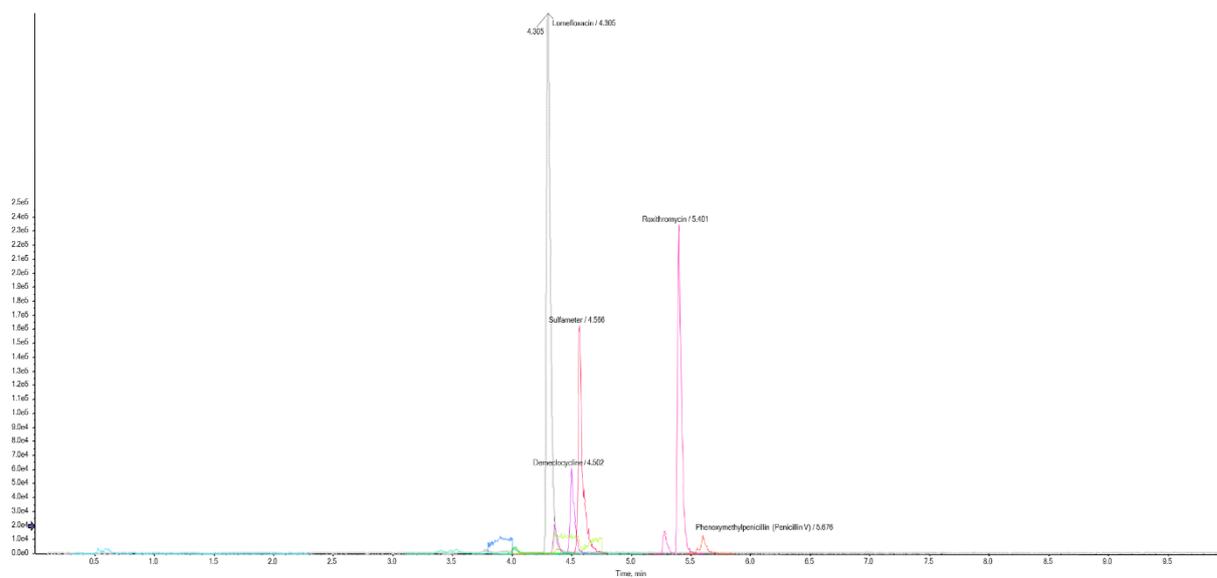


Figura 12 - Cromatograma de uma amostra real contendo os padrões internos.

7. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Os métodos analíticos UHPLC-ToF-MS e UHPLC-MS/MS utilizados na deteção e quantificação de 42 antibióticos em músculo de salmão proveniente de aquacultura foram validados de acordo com a Decisão da Comissão 2002/657/CE de 12 de Agosto de 2002 e foi possível comprovar o bom desempenho dos mesmos.

A análise de amostras reais demonstrou a inexistência de qualquer um dos compostos pesquisados neste trabalho. Apesar de se ter analisado um número significativo de amostras, não existia variabilidade entre elas, dado que, todas elas tinham origem na Europa, nomeadamente na Noruega e uma na Dinamarca. Como vimos na revisão bibliográfica, na Noruega existe um controlo rigoroso destes compostos e os mesmos só são aplicados em casos extremos e com prescrição de um médico veterinário. Assim, tendo em conta estes fatores, concluímos que o resultado era o esperado.

Apesar dos resultados negativos nas amostras reais, podemos concluir a robustez do método através da análise de amostras fortificadas. O método é aplicável a músculo de salmão e os 7 compostos introduzidos na validação, podem ser introduzidos nas análises de rotina do laboratório.

Como perspetivas futuras, seria interessante adquirir amostras com diversas origens de forma a poder comparar com o presente trabalho e fazer extensão para um maior número de compostos e para outras espécies animais provenientes de aquacultura.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] KOBAYASHI, Mimako et al. - Fish to 2030: the role and opportunity for aquaculture. *Aquaculture Economics and Management*, 19 (2015) 282-300.
- [2] YTRESTØYL, Trine; AAS, Turid Synnøve; ÅSGÅRD, Torbjørn - Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture*, 448 (2015) 365-374.
- [3] LESTON, Sara et al. - The veterinary drug and environmental. In: BORGEARO, Sarah R. *Animal Feed: Types, Nutrition and Safety*. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2011. ISBN 9781612093468, 61-83.
- [4] FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION - *The State of World Fisheries and Aquaculture: Contributing to food security and nutrition for all*. Rome: FAO, 2016. ISBN 9789251910852.
- [5] PEREIRA, André M. P. T. et al. - Fluoroquinolones and Tetracycline Antibiotics in a Portuguese Aquaculture System and Aquatic Surroundings: Occurrence and Environmental Impact. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 78:15 (2015) 959-975.
- [6] SANTOS, Lúcia; RAMOS, Fernando - Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 52 (2016) 16-30.
- [7] CARDOSO, Carlos et al. - Survey into the seafood consumption preferences and patterns in the portuguese population. Gender and regional variability. *Appetite*, 64 (2013) 20 – 31.
- [8] WWF MEDITERRANEAN - *Seafood and the Mediterranean: Local tastes, Global markets*. Switzerland: WWF – World Wide Fund For Nature, 2017 [Acedido a 12 de Junho de 2018]. Disponível na Internet: https://www.fishforward.eu/wp-content/uploads/2015/06/WWF_Seafood-and-the-Mediterranean_final.pdf
- [9] INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA, I. P - *Balança Alimentar Portuguesa 2012-2016*, Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I. P, 2017, ISBN 9789892503899
- [10] LEITÃO, Francisco et al. - Reconstructed catches and trends for mainland Portugal fisheries between 1938 and 2009: implications for sustainability, domestic fish supply and imports. *Fisheries Research*, 155 (2014) 33 – 50.
- [11] RHEE, Jinnie J. et al. - Fish Consumption, Omega-3 Fatty Acids, and Risk of Cardiovascular Disease. *American Journal of Preventive Medicine*, 52:1 (2017) 10-19.
- [12] CARDOSO, Carlos et al. - Methylmercury Risks and EPA + DHA Benefits Associated with Seafood Consumption in Europe. *Risk Analysis*, 30:5 (2010) 827-840.
- [13] WALLIN, Alice et al. - Fish Consumption, Dietary Long-Chain n-3 Fatty Acids, and Risk

of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 35:4 (2012) 918-929.

[14] RAMEL, A. et al. - Effects of weight loss and seafood consumption on inflammation parameters in young, overweight and obese European men and women during 8 weeks of energy restriction. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64:9 (2010) 987-993.

[15] CONTI, Gea et. al. - Determination of illegal antimicrobials in aquaculture feed and fish: An ELISA study. *Food Control*, 50 (2015) 937-941.

[16] GUIDI, Letícia Rocha et al. - A simple, fast and sensitive screening LC-ESI-MS/MS method for antibiotics in fish. *Talanta*, 163 (2017) 85 – 93.

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

[18] GASTALHO, Soraia; SILVA, Gabriela; RAMOS, Fernando - Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 3:1 (2014) 29-45.

[19] RIGOS, G.; BITCHAVA, K.; NENGAS, I. - Antibacterial drugs in products originating from aquaculture: assessing the risks to public welfare. *Mediterranean Marine Science*, 11:1 (2010) 33-41.

[20] TORT, Lluís - Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 35:12 (2011) 1366 – 1375.

[21] TORRECILLAS, S. et al. - Effects on mortality and stress response in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), fed mannan oligosaccharides (MOS) after *Vibrio anguillarum* exposure. *Journal of Fish Diseases*, 35:8 (2012) 591 – 602.

[22] HEUR, Ole E. et al. - Human Health Consequences of Use of Antimicrobial Agents in Aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*, 49:8 (2009) 1248-1253.

[23] DEFOIRDT, Tom; SORGELOOS, Patrick; BOSSIER, Peter - Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*, 14:3 (2011) 251 – 258.

[24] ROMERO, J.; FEIJOÓ, C.; NAVARRETE, P. - Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. In CARVALHO, Edmir. *Health and Environment in Aquaculture*. InTech, 2012, ISBN 9789535104971, 275-306.

[25] FREITAS, Andreia et al. - Multi-residue and multi-class determination of antibiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by ultra high-performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31:5 (2014) 817 – 826.

[26] ROSA, João et al. - Evaluation of antimicrobials residues in farmed gilthead seabream

- (*Sparus aurata*) after administration through medicated feed. *Food Control*, 86 (2018) 110 – 116.
- [27] MONTEIRO, S. H. et al. - Multiresidue antimicrobial determination in Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) cage farming by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Aquaculture*, 447 (2015) 37-43.
- [28] GBYLIK, M. et al. - Multi-residue determination of antibiotics in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30:6 (2013) 940-948.
- [29] RANJAN, Amit et al. - Prospects of Medicated Feed in Aquaculture. *Nutrition and Food Science*, 3:4 (2017) 1-9.
- [30] ECONOMOU, Vangelis; GOUSIA, Panagiota - Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, 8 (2015) 49-61.
- [31] BROUGHTON, Edward I.; WALKER, Damian G. - Policies and practices for aquaculture food safety in China. *Food Policy*, 35:5 (2010) 471-478.
- [32] BURRIDGE, Les et al. - Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306 (2010) 7-23.
- [33] DONE, Hansa Y.; VENKATESAN, Arjun K.; HALDEN, Rolf U. - Does the Recent Growth of Aquaculture Create Antibiotic Resistance Threats Different from those Associated with Land Animal Production in Agriculture?. *The AAPS Journal*, 17:3 (2015) 513-524.
- [34] ROSSOLINI, Gian Maria et al. - Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*, 18 (2014) 56-60.
- [35] PIKKEMAAT, Mariël G. - Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395:4 (2009) 893-905.
- [36] GUIDI, Letícia Rocha et al. - Quinolones and tetracyclines in aquaculture fish by a simple and rapid LC- MS/MS method. *Food Chemistry*, 245 (2018) 1232- 1238.
- [37] COMPANYÓ, R. et al. - Antibiotics in food: Legislation and validation of analytical methodologies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395 (2009) 877- 891.
- [38] CHÁFER-PERICÁS, Consuelo et al. - Immunochemical determination of oxytetracycline in fish: Comparison between enzymatic and time-resolved fluorometric assays. *Analytica Chimica Acta*, 662 (2010) 177-185.
- [39] LOPES, Renata Pereira et al. - Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 895:896 (2012) 39-47.
- [40] QUESADA, Silvia; PASCHOAL, Jonas; REYES, Felix - Considerations on the Aquaculture

Development and on the Use of Veterinary Drugs: Special Issue for Fluoroquinolones - A Review. *Journal of Food Science*, 78:9 (2013) 1321- 1333.

[41] COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS - Livro Branco sobre a Segurança dos Alimentos. Bruxelas: Comissão das Comunidades Europeias, 2000, ISBN COM (1999) 719 final.

[42] MORRIS, D. J. et al. - EU sampling strategies for the detection of veterinary drug residues in aquaculture species: Are they working? *Drug Testing and Analysis*, 4:1 (2012) 1-9.

[43] COMISSÃO EUROPEIA - Diretiva 96/23/CE do Conselho de 29 de Abril de 1996 relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respetivos produtos e que revoga as Diretivas 85/358/CEE e 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, (1996) 1-23.

[44] PARLAMENTO EUROPEU, CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA - REGULAMENTO (CE) N.º 470/2009 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 6 de Maio de 2009. *Jornal Oficial da União Europeia*, (2009) 11- 22.

[45] COMISSÃO EUROPEIA - REGULAMENTO (UE) N.º 37/2010 DA COMISSÃO de 22 de Dezembro de 2009. *Jornal Oficial da União Europeia*, (2009) 1-72.

[46] COMISSÃO EUROPEIA - Decisão da comissão de 12 de agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, (2002) 1-29.

[47] HARRIS, Daniel C. - *Quantitative Chemical Analysis*. 8th Ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2011. ISBN 1429218150.

[48] SERRANO, Ana; BOMMEL, Maarten; HALLETT, Jessica - Evaluation between ultrahigh pressure liquid chromatography and high-performance liquid chromatography analytical methods for characterizing natural dyestuffs. *Journal of Chromatography A*, 1318 (2013) 102-111.

[49] GUMUSTAS, Mehmet et al. - UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia*, 76 (2013) 1365- 1427.

[50] QUESADA, Silvia; PASCHOAL, Jonas; REYES, Felix - A simple method for the determination of fluoroquinolone residues in tilapia (*Oreochromis niloticus*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) employing LC-MS/MS QToF. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30:5 (2013) 813-825.

[51] DUBREIL, Estelle et al. - Validation approach for a fast and simple targeted screening method for 75 antibiotics in meat and aquaculture products using LC-MS/MS. *Food Additives*

& Contaminants: Part A, 34:4 (2017) 453-468.

[52] NUNES, Kátia S. D. et al. - Multiresidue Method for Quantification of Sulfonamides and Trimethoprim in Tilapia Fillet by Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Using QuEChERS for Sample Preparation. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018 (2018) 1-10.

[53] FREITAS, Andreia; BARBOSA, Jorge; RAMOS Fernando - Multi-residue and multi-class method for the determination of antibiotics in bovine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Meat Science*, 98 (2014) 58-64.

[54] FREITAS, Andreia; BARBOSA, Jorge; RAMOS, Fernando - Avaliação do desempenho de métodos analíticos de pesquisa de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal: Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$). *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 2:1 (2013) 81-86.

[55] FREITAS, Andreia et al. - Multi-residue and multi-class determination of antibiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31:5 (2014) 817-826.