

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

JOSÉ MAURÍCIO ARMELIM

**Ocorrência de antibióticos em fazendas de cultivo de
camarão (*Litopenaeus vannamei*) no estado do
Rio Grande do Norte – Brasil**

Piracicaba

2019

JOSÉ MAURÍCIO ARMELIM

**Ocorrência de antibióticos em fazendas de cultivo de
camarão (*Litopenaeus vannamei*) no estado do
Rio Grande do Norte – Brasil**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Dissertação apresentada ao Centro de
Energia Nuclear na Agricultura da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Química na
Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Valdemar Luiz
Tornisielo**

Piracicaba

2019

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Armelim, José Maurício

Ocorrência de antibióticos em fazendas de cultivo de camarão (*Litopenaeus vannamei*) no estado do Rio Grande do Norte – Brasil / José Maurício Armelim; orientador Valdemar Luiz Tornisielo. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

103 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Agentes microbianos 2. Aquicultura 3. Contaminantes emergentes
4. Cromatografia líquida 5. Espectrometria de massas 6. Resíduos químicos
I. Título

CDU 351.773 : 577.18

Elaborada por:

Marilia Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Dedico

À minha esposa Flávia, com amor e gratidão por todo apoio, carinho, inspiração e motivação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo pela oportunidade e atenção que muito contribuiu para meu desenvolvimento intelectual e científico.

Ao Rodrigo Pimpinato pela sabedoria e prontidão nos auxílios técnicos.

Ao Carlos Dorelli pelos conselhos e ensinamentos trazidos durante os trabalhos.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP pela oportunidade e estrutura oferecida para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Prof. Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias pelo auxílio estatístico.

Ao Prof Dr. Antonio Carlos Cestaro pelo apoio estratégico nas coletas e preparo das amostras em Natal.

Às fazendas de cultivo de camarão e seus funcionários pela abertura e coleta das amostras.

À bibliotecária Marília pelo carinho e revisão da dissertação.

Aos amigos da cromatografia: Profa. Dra. Rosana Freguglia, Dra. Graziela Andrade, Dr. Sérgio Monteiro, Dr. Franz Vilca, Beatriz Barion, Renan Ravelli e Suellen Ferraz, pelas dicas.

À Nicoli Moraes, Leonardo Junqueira e Felipe Alonso pelos auxílios com as atividades de laboratório.

À doutoranda Glaucia Olivatto pelas valiosas dicas de eventos e redação científica.

À toda equipe da Seção de Pós-Graduação pela sempre cordialidade e prestatividade com que me acolheram.

A todos os amigos do Laboratório de Ecotoxicologia com quem convivi e que contribuíram para os momentos felizes que vivenciei durante a realização dos trabalhos: à secretária Roberta, Dra. Ana Paula, Dr. Kássio, Vanessa, Cássio, Gustavo, Mayara, Fernanda e Ricardo.

Às agências de fomento pelo apoio e concessão da bolsa de mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e CNPq (Processo 134241/2018-5).

A Agência Internacional de Energia Atômica pelo apoio financeiro à realização dessa pesquisa.

A minha querida Mãe e todos meus familiares e amigos que contribuíram para minha volta aos estudos.

Muito obrigado!

“Sempre parece impossível até que seja feito”

Nelson Mandela

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

George Bernard Shaw

“Às vezes, acontecem coisas tão maravilhosas que jamais teriam acontecido se tudo tivesse dado certo”.

Autor desconhecido

RESUMO

ARMELIM, J. M. **Ocorrência de antibióticos em fazendas de cultivo de camarão (*Litopenaeus vannamei*) no estado do Rio Grande do Norte - Brasil.** 2019. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

Considerando os fatores de uso reconhecido de diferentes antibióticos na carcinicultura mundial, a potencialidade produtiva de camarões da região nordeste brasileira, os escopos de monitoramento de resíduos dos órgãos fiscalizadores e os riscos associados ao uso dos antibióticos à segurança alimentar e saúde pública, quanto a toxicidade e mecanismos de desenvolvimento da resistência microbiana patogênica, principalmente em meio aquático, o estudo teve por objetivo determinar simultaneamente, pela técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com fonte de ionização electrospray (LC-ESI-MS/MS), a ocorrência de multiclassas e multirresíduos de 12 antibióticos, pertencentes às tetraciclinas, sulfonamidas, fluoroquinolonas e anfenicóis em amostras de camarão (*Litopenaeus vannamei*), água e sedimentos, procedentes de 5 fazendas criadoras de camarões com modelos distintos de produção, presentes no estado do Rio Grande do Norte-Brasil. Foram selecionados viveiros em fase de despesca para coleta das 3 matrizes e pontos a montante e jusante dos viveiros, para coleta das matrizes ambientais destinadas ao estudo de distribuição espacial dos resíduos nas fazendas. Parâmetros físico-químicos de qualidade da água foram avaliados durante as coletas. Foram empregadas as técnicas de extração em fase sólida *on line* a LC-MS/MS para sedimentos, cartuchos Captiva para filtragem dos extratos de músculo de camarões e extração em fase sólida *off line* a LC-MS/MS em água, com as amostras acondicionadas em cartuchos SPE previamente a realização do transporte ao laboratório. Os métodos cromatográficos foram validados para os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão e estabilidade de longa duração dos analitos na matriz. Os LQs encontrados variaram de 0,82 (sulfadimetoxina) a 7,63 (cloranfenicol) ng ml⁻¹ para água, 1,23 (tetraciclina) a 15,99 (cloranfenicol) µg kg⁻¹ para sedimentos e 1,24 (enrofloxacina) a 12,05 (sulfatizol) µg kg⁻¹ para camarão. Resíduos de sulfadimetoxina (23,4 ng L⁻¹) e florfenicol (10,78 a 175,77 ng L⁻¹) foram os únicos antibióticos detectados e quantificados em água de viveiros. Em sedimentos, resíduos de oxitetraciclina, enrofloxacina e norfloxacina foram detectados somente à montante dos viveiros e em níveis <LQ. Não houve detecção dos antibióticos em camarão. Resíduos de florfenicol exibiram distribuição espacial à jusante (21,18 a 58,15 ng L⁻¹) e montante (22,63 ng L⁻¹) dos viveiros. A detecção de enrofloxacina e norfloxacina (<LQ) em sedimentos a montante de duas fazendas, sugerem a inclusão dos compostos no programa nacional de controle de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal (PNCRC/Animal) do

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o monitoramento em camarões de cultivo. Os resultados de florfenicol ($< 60 \text{ ng L}^{-1}$) e oxitetraciclina, enrofloxacina e norfloxacina ($< \text{LQ}$) estiveram sob influência de instabilidade e efeito matriz. Por apresentar particularidades em uso e épocas, estudos para avaliação temporal dos resíduos são também recomendados.

Palavras-chave: Carcinicultura. Camarão. Sedimentos. Água superficial. Antibióticos. Resíduos. Método multiclases e multiresíduos. Antimicrobianos. SPE-*On line*. SPE-*Off line*. LC-ESI-MS/MS.

ABSTRACT

ARMELIM, J. M. **Occurrence of antibiotics in shrimp farms (*Litopenaeus vannamei*) - Rio Grande do Norte state – Brazil.** 2019. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

Considering the factors of recognized use of different antibiotics in the global shrimp farming, the productive potential of shrimps in the northeastern Brazilian region, the residue monitoring scopes of inspection agencies and the risks associated with the use of antibiotics for food safety and public health, as well as toxicity and mechanisms of development of pathogenic microbial resistance, especially in the aquatic environment, the aim of the study was to determine, by the liquid chromatography coupled to mass spectrometry with source (LC-ESI-MS/MS), the occurrence of multiclassed and multiresidues of 12 antibiotics belonging to tetracyclines, sulfonamides, fluoroquinolones and amphenicols in shrimp (*Litopenaeus vannamei*), water and sediments from 5 farms shrimp farms with different models of production, present in the state of Rio Grande do Norte-Brazil. Raised nurseries were selected for collection of the 3 matrices and points upstream and downstream of the nurseries, for the collection of environmental matrices destined to the study of spatial distribution of residues in the farms. Physical-chemical parameters of water quality were evaluated during sampling. *On line* Solid-phase extraction techniques were used to LC-MS/MS for sediment, Captiva cartridges for filtration of shrimp muscle extracts and *off-line* solid-phase extraction to LC-MS/MS in surface water, with the samples packed in SPE cartridges prior to the transportation to the laboratory. The chromatographic methods validations were done for the parameters of selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), accuracy, precision and long-term stability of the analytes in the matrix. LOQs ranged from 0.82 (sulfadimethoxine) to 7.63 (chloramphenicol) ng mL⁻¹ for water, 1.23 (tetracycline) at 15.99 (chloramphenicol) µg kg⁻¹ for sediment and 1.24 (enrofloxacin) at 12.05 (sulfatiazole) µg kg⁻¹ for shrimp. Sulfadimethoxine (23.4 ng L⁻¹) and florfenicol (10.78 to 175.77 ng L⁻¹) residues were the only antibiotics detected and quantified in nursery water. In sediments, oxytetracycline, enrofloxacin and norfloxacin residues were detected only upstream of the nurseries and at levels <LQ. There was no detection of antibiotics in shrimp. Florfenicol residues showed spatial distribution downstream (21.18 to 58.15 ng L⁻¹) and upstream (22.63 ng L⁻¹) of the nurseries. The detection of enrofloxacin and norfloxacin (<LQ) in sediments, upstream of two farms, suggest the inclusion of the compounds in the National Program for the Control of Residues and Contaminants in Food of Animal Origin (PNCRC/Animal) of the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock, and Food Supply (MAPA), program for monitoring in culture shrimp. The results shown by the real samples for florfenicol (<60 ng L⁻¹) and oxytetracycline, enrofloxacin and norfloxacin (<LQ) were under influence of instability and matrix effect. Due to particularities in

use and times, studies for the temporal evaluation of residues are also recommended.

Keywords: Carcinicultura. Shrimp. Sediments. Surface water. Antibiotics. Residue. Multiclass and multiresidue method. Antimicrobials. SPE-*On line*. SPE-*Off line*. LC-ESI-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1- | Diagrama de conceito de produtos químicos antimicrobianos..... | 24 |
| Figura 2- | Modelo de cenários e maneiras pelas quais o uso de antibióticos veterinários pode causar aumento de infecções resistentes em humanos..... | 32 |
| Figura 3- | Campo de amostragem contendo a localização e região das fazendas produtoras de camarão no estado do Rio Grande do Norte, RN, Brasil..... | 47 |
| Figura 4- | Sistema <i>on line</i> SPE-LC-MS/MS com direcionamento das fases móveis, tempo de eluição das fases móveis na coluna de carregamento e coluna analítica e tempo de mudança do posicionamento da válvula..... | 53 |
| Figura 5- | Cromatogramas dos extratos de amostra em branco e de amostra em branco fortificado (60 ng mL^{-1}), matriz água..... | 61 |
| Figura 6- | Cromatogramas dos extratos de amostra em branco e de amostra em branco fortificado ($200 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$), matriz sedimentos..... | 62 |
| Figura 7- | Cromatogramas dos extratos de amostra em branco e de amostra em branco fortificado ($200 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$), matriz camarão..... | 63 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|---|-----|
| Tabela 1- | Antibióticos estudados, classe, <i>CAS number</i> , limites máximos de resíduo (LMR) em camarão de cultivo, fórmula molecular, massa molar e pKa..... | 44 |
| Tabela 2- | Antibióticos, tempos de retenção (tR), íons precursores, íons produtos, energia de fragmentação e energia de colisão..... | 52 |
| Tabela 3- | Média de pesos dos camarões íntegros e após remoção da carapaça, cefalotórax, calda, patas e intestino..... | 59 |
| Tabela 4- | Equações da reta, coeficientes de correlação (r^2) e resultados do teste F (<i>Goodness-of-fit</i>) para os antibióticos estudados em água..... | 64 |
| Tabela 5- | Equações da reta, coeficientes de correlação (r^2) e resultados do teste F (<i>Goodness-of-fit</i>) para os antibióticos estudados em sedimentos..... | 65 |
| Tabela 6- | Equações da reta, coeficientes de correlação (r^2) e resultados do teste F (<i>Goodness-of-fit</i>) para os antibióticos estudados em camarão..... | 65 |
| Tabela 7- | Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), recuperação e precisão dos antibióticos para amostras de água..... | 67 |
| Tabela 8- | Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), recuperação e precisão dos antibióticos para amostras de sedimentos..... | 68 |
| Tabela 9- | Limite de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), recuperação e precisão dos antibióticos para amostras de camarão..... | 69 |
| Tabela 10- | Características físico-químicas das amostras de água nos diferentes pontos de coleta em cada fazenda de cultivo de camarão..... | 72 |
| Tabela 11- | Resíduos de antibióticos com detecção e quantificação..... | 76 |
| Anexo A- | Resultados de estabilidade de longa duração dos antibióticos na matriz água, acondicionada em cartuchos SPE HLB Oasis 500 mg, 6 mL..... | 101 |
| Anexo B- | Resultados de estabilidade de longa duração dos antibióticos na matriz sedimentos..... | 102 |
| Anexo C- | Resultados de estabilidade de longa duração dos antibióticos na matriz músculo de camarão..... | 103 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 21 |
| 2.1 | Panorama da carcinicultura no Brasil e no mundo | 21 |
| 2.2 | Antibióticos e características | 23 |
| 2.2.1 | Antibióticos na carcinicultura | 26 |
| 2.2.2 | Antibióticos no ambiente | 29 |
| 2.2.3 | Resistência aos antibióticos | 30 |
| 2.3 | Emprego da técnica de LC-MS/MS na determinação de antibióticos nas matrizes da carcinicultura | 33 |
| 2.4 | Validação de métodos analíticos | 38 |
| 3 | OBJETIVOS | 41 |
| 3.1 | Objetivo Geral | 41 |
| 3.2 | Objetivo Específico | 41 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 42 |
| 4.1 | Equipamentos e instrumentação | 42 |
| 4.2 | Solventes e Reagentes | 42 |
| 4.3 | Preparo de soluções padrões | 43 |
| 4.4 | Coleta e preparo das amostras | 46 |
| 4.4.1 | Pontos de coleta | 46 |
| 4.4.2 | Caracterização das Fazendas | 46 |
| 4.4.3 | Coleta das amostras | 46 |
| 4.4.4 | Preparo das amostras | 48 |
| 4.5 | Procedimento analítico | 49 |
| 4.5.1 | Extração dos antibióticos em amostras de água | 49 |
| 4.5.2 | Extração dos antibióticos em amostras de sedimentos | 49 |
| 4.5.3 | Extração dos antibióticos em amostras de camarão | 50 |
| 4.6 | Determinação dos antibióticos pela técnica de LC-MS/MS | 50 |
| 4.7 | Validação, quantificação e controle de qualidade dos métodos | 54 |
| 4.8 | Análise estatística | 56 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 57 |
| 5.1 | Coleta das amostras | 57 |
| 5.2 | Caracterização das fazendas | 57 |
| 5.3 | Preparo, extração e determinação dos antibióticos | 58 |
| 5.4 | Otimização do SPE <i>off line</i> para análise de água | 59 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.5 | Validação dos métodos cromatográficos | 60 |
| 5.5.1 | Seletividade | 61 |
| 5.5.2 | Linearidade | 63 |
| 5.5.3 | Limites de detecção e quantificação, recuperação e precisão | 66 |
| 5.5.4 | Estabilidade de longa duração | 69 |
| 5.6 | Parâmetros físico-químicos da água | 71 |
| 5.7 | Determinação de antibióticos em amostras de água | 75 |
| 5.8 | Determinação de antibióticos em amostras de sedimentos | 79 |
| 5.9 | Determinação de antibióticos em amostras de camarão | 81 |
| 6 | CONCLUSÕES | 83 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 85 |
| | REFERÊNCIAS | 86 |
| | ANEXOS | 99 |

1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos são de suma importância no tratamento de doenças infecciosas bacterianas que acometem humanos, animais e vegetais (KÜMMERER, 2009; FRANKLIN et al., 2016). Na produção de alimentos de origem animal, são consumidos em larga escala e agregam finalidades profiláticas e de aditivos melhoradores de desempenho (FAO, 2016b). As características de complexidade físico-químicas, metabolização e mobilidade dos resíduos no meio ambiente e na cadeia alimentar (SARMAH et al., 2006; KÜMMERER, 2009; REGITANO; LEAL, 2010; GAO et al., 2012a; CHEN et al., 2015; DENG et al., 2016; PAN; CHU, 2017; FAO, 2017a; ZHANG et al., 2018) têm contribuído, sobretudo em função do uso inadequado, para pressão seletiva e evolução acelerada de patógenos bacterianos resistentes e a circulação de genes resistentes (FAO, 2016a; SANTOS; RAMOS, 2018; SCOTT et al., 2018), um risco à produtividade de proteína animal, segurança alimentar e saúde da população (FAO, 2016a; ECDC, 2017; SANTOS; RAMOS, 2018), sinalizando necessidade de ações multidisciplinares e de monitoramento do uso das diferentes classes dos produtos. Segundo O'Neill (2016), cerca de 700.000 mortes humanas a cada ano no mundo estão relacionadas à resistência microbiana e até 2050 o prejuízo global está estimado em 100 trilhões de dólares.

A criação de camarões ou carcinicultura é uma importante ramificação da aquicultura, com casos dessa problemática em que o uso de antibióticos (HANEKAMP; BAST, 2015) como os das classes das sulfonamidas, fluoroquinolonas, tetraciclina e anfenicóis, é reconhecido (CHEN et al., 2015; LI et al., 2016; ZHANG et al., 2018; YUAN et al., 2019). Camarões da espécie *Litopenaeus Vannamei* são os mais cultivados e de relevância econômica ao setor (FAO, 2016b; FAO, 2019) e onde resíduos e cepas de bactérias patogênicas com multirresistência a antibióticos têm sido identificados, inclusive para aqueles com uso já descontinuado, mas ainda presentes, ligados a sedimentos que atrasam sua biodegradação (CARVALHO et al., 2013; COSTA et al., 2015; LAI et al., 2015; ROCHA et al., 2016). Ações imediatistas no combate a surtos de doenças ou mesmo no uso racional merecem enfoque das autoridades (FAO, 2016b; LI et al., 2016).

Os alimentos representam uma das principais rotas de exposição a uma infinidade de substâncias químicas e microrganismos (QUESADA et al., 2013; KING et al., 2017; ELBASHIR et al., 2018).

As políticas de segurança alimentar para balizamento dos parâmetros de qualidade e limites para resíduos químicos em camarões e outros alimentos da aquicultura, diferem entre os países e muitas estão espelhadas no Codex Alimentarius (CODEX, 2015). No entanto, pouca ou nenhuma fiscalização está presente em muitos dos principais produtores (MARON: SMITH: NACHMAN, 2013; SANTOS: RAMOS, 2018). No Brasil, por exemplo, são importantes os parâmetros e limites máximos de resíduos (LMRs) de antibióticos instituídos pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC/Animal) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), do qual fazem parte, peixes e camarões de cultivo (BRASIL, 1999; BRASIL, 2017).

As estratégias de mitigação dos antibióticos no meio ambiente permanecem um desafio do ponto de vista econômico e ecológico para a atual e futuras gerações (KAESEBERG et al., 2018). Atualmente, os antibióticos estão incluídos no grupo de compostos considerados como poluentes ambientais emergentes (CARVALHO; SANTOS, 2016; MONTAGNER et al., 2017), sendo pauta em diversos fóruns mundiais (OMS, OIE, FAO, Codex Alimentarius e ONU), para promoção do uso racional e implantação do conceito de saúde única (*One Health*), que coloca em harmonia às saúdes humana, animal e ambiental (DOYLE et al., 2013; SANTOS; RAMOS, 2018; BRASIL, 2019a).

Considerando a potencialidade mundial e brasileira na criação de camarões (IBGE, 2013-2016; RIBEIRO et al., 2014; ROCHA, 2018; FAO, 2018), é extremamente útil, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas de pesquisa e controles, fazendo uso de métodos sensíveis e confiáveis de detecção e quantificação de resíduos de antibióticos, que servirão de suporte aos mercados consumidores e a órgãos reguladores. A técnica analítica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) sobressai no controle de qualidade de emprego e regulamentação dessas moléculas, sendo importante o desenvolvimento e aperfeiçoamento constante de métodos e avaliações das boas práticas de cultivo neste sentido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama da carcinicultura no Brasil e no mundo

A produção de camarões feita em cativeiro, denominada de carcinicultura, é um dos seguimentos presentes na aquicultura (cultivo de organismos aquáticos diversos, como peixes, moluscos, crustáceos e plantas) de maior destaque em termos de valor agregado em produção (FAO, 2009; FAO, 2016b; SUANTIKA et al., 2018). O domínio do ciclo reprodutivo das espécies atrativas, desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas de reprodução em laboratório, melhoramento genético, e o cultivo em cativeiro, tem garantido a oferta de camarões ao constante e crescente mercado consumidor mundial. As técnicas de criações em cativeiros permitiram ao mercado a oferta e possibilidades de escolhas por espécies e padrões de qualidade atraentes aos requintes culinários. Dos camarões também se obtém sub-produtos como quitosana, carotenóides e astaxantina, de ampla aplicação em tratamento de água, cosméticos e artigo de toalete, alimentos e bebidas, agroquímicos e indústria farmacêutica (FAO, 2018).

A espécie mundialmente mais cultivada é a do camarão branco do pacífico, *Litopenaeus Vannamei*, nativa da Costa do Pacífico desde o norte do México, passando pela América Central, até chegar a América do Sul, ao norte do Peru. Possui alta capacidade de adaptação em diferentes meios aquáticos e alta produtividade (FAO, 2019). A produção mundial de *Litopenaeus Vannamei* de 2010 a 2016 cresceu 54,6%. China, Vietnã, Indonésia, Índia, Equador e Tailândia mantem-se na liderança em produção. Os principais mercados consumidores concentram-se na Europa, Japão e EUA (FAO, 2016a).

No geral, a produção mundial de crustáceos em 2016, da qual mais de 50% teve a representatividade de *Litopenaeus Vannamei*, foi de 7,9 milhões de toneladas com valor de venda primária estimada em 57,1 bilhões de dólares (FAO, 2018). O Brasil ocupou a 11ª posição do ranking (FAO, 2018), um desempenho aquém do auge produtivo vivenciado em 2003 onde foi líder mundial de produtividade (6084 kg/ha) (ROCHA, 2018). Mesmo assim, segundo Rocha (2018), o Brasil ainda apresenta amplas oportunidades aos extensos 1.000.000 de hectares disponíveis para cultivo. A produção do Brasil de camarão cultivado em 2016 foi de 52.100 toneladas, exploradas em 25.000 ha e com valor de produção de quase

R\$ 889 milhões de reais. Comparada a produção de 2015 em toneladas, houve queda de 26,1%, justificada pelo vírus da mancha branca, responsável por alta mortalidade nos viveiros dos criadores do nordeste brasileiro (IBGE, 2016; FAO, 2018; ROCHA, 2018). A principal região produtora do *Litopenaeus Vannamei* no país concentra-se no Nordeste com terrenos e condições climáticas ideais para a carcinicultura (RIBEIRO et al., 2014; ROCHA, 2018). Os estados do Ceará e Rio Grande do Norte, juntos em média, são responsáveis por mais de 90% da produção nacional de acordo com dados do IBGE (IBGE, 2013-2016). Desde 2013 o estado do Ceará vem mantendo a liderança na produção nacional, seguido do estado do Rio Grande do Norte, pioneiro da carcinicultura no Brasil (RIBEIRO et al., 2014; IBGE, 2013-2016).

Camarões adultos ou com características aptas para o consumo, abastecem o mercado consumidor após passagem por pelo menos dois estágios produtivos. O primeiro ou larvicultura, consiste da geração de pós-larvas em laboratório, precedidas dos ciclos de metamorfose que abrange ovo, náuplio, zoea e mysis. O segundo ou engorda, as pós-larvas povoam viveiros ou lagoas, onde permanecem de 70 a 90 dias até que ocorra a despesca e entrega da produção ao processamento industrial. É comum, porém pode ser suprimido, um estágio de berçário presente entre a larvicultura e engorda, com objetivo de aclimatar e formar pré-estoque de pós-larvas juvenis (em 10 a 15 dias), antes de serem transferidas definitivamente para os viveiros de engorda. Grande parte dos empreendimentos brasileiros adquirem as pós-larvas de empresas especializadas (RIBEIRO et al., 2014; ABCC, 2017a; FAO, 2019).

Os sistemas de cultivo na fase de engorda se diferenciam principalmente pela capacidade produtiva e recursos empregados para captação, drenagem e renovação de água, lagoas de sedimentação, aeradores, alimentação e programas de monitoramento da qualidade. Três principais modelos se destacam com relação à capacidade produtiva: extensivo (150 a 500 kg/ha/ciclo), semi-intensivo (500 a 2000 kg/ha/ciclo) e intensivo (7 a 20 ton/ha/ciclo) que representam, respectivamente, baixa (4 a 10 pós-larvas/m²), média (10-30 pós-larvas/m²) e alta densidade (60-300 pós-larvas/m²) de povoamento dos viveiros de engorda. Um quarto modelo ou super-intensivo com capacidade de produção para quase 70 toneladas/ha tem sido pauta de pesquisas nos Estados Unidos (ABCC, 2012; RIBEIRO et al., 2014; FAO, 2019).

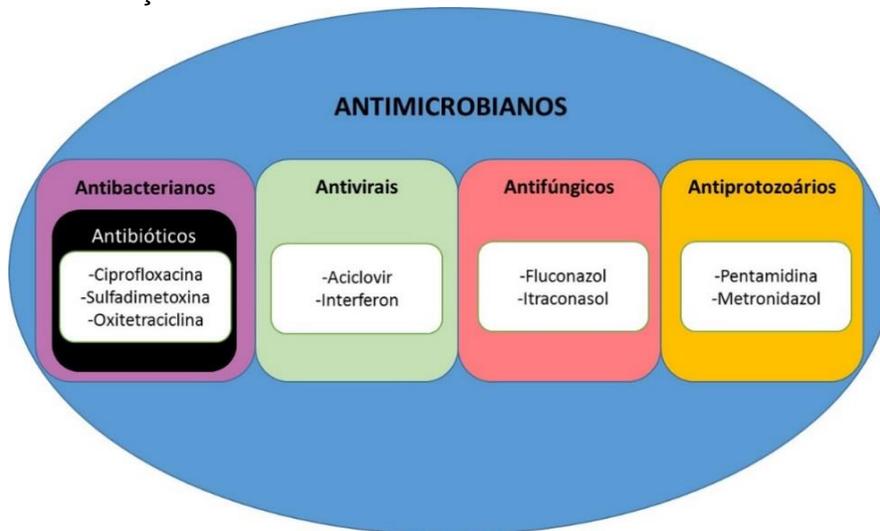
Quanto maior a densidade de povoamento dos tanques e viveiros, maior é a probabilidade de surtos de doenças e maiores são os controles necessários para a manutenção da sobrevivência e do bem-estar dos camarões, sendo em muitos casos necessárias intervenções profiláticas e terapêuticas com uso de antimicrobianos já desde os estágios de geração de pós-larvas até a engorda, para prevenção ou tratamento de enfermidades causadas principalmente por bactérias, vírus, fungos e protozoários (HOLMSTROM et al., 2003; GRASLUND; HOLMSTROM; WAHLSTROM, 2003; FLEGEL, 2012; CABELLO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014; ROCHA et al., 2016; TASSANAKAJON et al., 2018; SANTOS; RAMOS, 2018). Além disso, o equilíbrio entre os fatores biológicos e não biológicos, ditam a qualidade do ambiente de cultivo, combatem o estresse e asseguram a manutenção da resposta imunológica dos camarões a enfermidades (CHEN; HE, 2019). Em situações de estresse os animais deixam de se alimentar e aumentam as chances de instalação de enfermidades. As intervenções com recursos químicos são justificadas muitas vezes, nesses casos (CABELLO et al., 2013; SANTOS; RAMOS, 2018).

A Associação Brasileira de Criadores de Camarões (ABCC), sociedade civil, com sede em Natal, estado do Rio Grande do Norte, tem presença atuante em medidas para aprimoramento de técnicas de cultivo, pesquisas, crescimento econômico e sustentável da cultura, destacando-se os procedimentos de boas práticas de manejo e medidas de biossegurança para carcinicultura brasileira (ABCC, 2012).

2.2 Antibióticos e características

Todo composto químico produzido de forma natural ou artificial que iniba o crescimento ou cause a morte de microrganismos é considerado um antimicrobiano, um termo que generaliza num grande conjunto, diferentes compostos com finalidades seletivas, tais como os antibacterianos, antivirais, antifúngicos e antiprotozoários, com espectro de ação para bactérias, vírus, fungos e protozoários, respectivamente. No conjunto dos antibacterianos se enquadram os desinfetantes, anti-sépticos e o subconjunto dos antibióticos (Figura 1), (FRANKLIN et al., 2016).

Figura 1 - Diagrama de conceito de produtos químicos antimicrobianos. Os antibióticos, um subconjunto de antibacterianos, são um tipo de antimicrobiano usado no tratamento e prevenção de infecções bacterianas



Fonte: Adaptado Franklin et al. (2016).

Produzidos por vias naturais, semi-sintéticas ou sintéticas, os antibióticos são de suma importância no tratamento de doenças infecciosas bacterianas que acometem humanos, animais e vegetais (KÜMMERER, 2009; FRANKLIN et al., 2016). Na produção de alimentos de origem animal, além do uso para fins terapêuticos, os antibióticos assumem finalidades profiláticas e de aditivos melhoradores de desempenho (FAO, 2016b). Dentre os antibióticos em uso não são raras as aplicações coincidentes tanto nas medicinas humana e veterinária, principalmente para animais produtores de alimentos, que os consomem em larga escala. Dos 51 antibióticos reportados pelos países com maior produção animal, 37 aparecem na lista da Organização Mundial da Saúde listados como criticamente importante ou altamente importante para a saúde humana (DONE et al., 2015; SANTOS; RAMOS, 2018).

O consumo de antibióticos na China em 2013 foi de 162.000 tons, sendo 77.760 tons destinadas ao consumo humano e 84.240 tons para animais, principalmente aves e suínos. No comparativo com a Inglaterra o consumo total Chinês foi 150 vezes maior. O consumo americano, nos anos 2011-2012 totalizou 3.290 tons para humanos e 14.600 tons para animais (ZHANG et al., 2015). Previsões traçadas pela FAO, estima que o Brasil em 2030 estará entre os principais

consumidores mundiais, seguido pela Rússia, Índia, China e África do Sul (FAO, 2017b). Na aquicultura, o consumo para produção de salmon no Chile, segundo maior produtor mundial, chega na ordem de 300 tons por ano. A produção Norueguesa, seu principal concorrente, usa menos de 1 ton por ano graças a investimentos em vacinação e boas práticas de produção (FAO, 2017b).

Os antibióticos estão agrupados em várias classes definidas em função das estruturas químicas ou mecanismos de ação (ZHOU-LJ et al., 2012). Na classe das tetraciclinas (TC) estão compostos com estrutura em anel nafta, são relativamente mais estáveis em condições ácidas que básicas e apresentam facilidade de fotodecomposição. As TCs formam complexos quelantes com íons metálicos divalentes, trivalentes e β -dicetonas e ligam-se fortemente a proteínas e grupos silanólicos. As fluoroquinolonas (FQs) apresentam um grupo amino em anel heterocíclico (piperazinil), complexam-se também com cátions divalentes, são insensíveis à hidrólise e ao aumento da temperatura, mas são suscetíveis à fotodegradação. Em comparação com TCs e FQs, as sulfonamidas (SAs) e alguns dos anfenicóis são muito móveis no solo devido à sua sorção relativamente fraca (SEIFRTOVÁ et al., 2009; ZHOU-LJ et al., 2012; UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE, 2019). Além disso, as SAs não são fáceis de serem degradadas e prevalecem em meio aquático (LI et al., 2014; LI et al., 2018b). Funcionalmente os antibióticos atuam como inibidores de síntese de parede celular, inibidores de síntese protéica e inibidores da síntese de ácidos nucleicos (ROCHA et al., 2016).

As moléculas de antibióticos são complexas a ponto de possuírem diferentes funções químicas dentro da mesma molécula, são anfóteras com diferentes valores de pKa, possuem massas molares variáveis (172 a 916 g mol⁻¹), baixos potenciais de volatilização (constante de Henry $< 4,1 \times 10^{-8}$ Pa m³ mol⁻¹, pressão de vapor $< 1,1 \times 10^{-11}$ mm Hg) e, a presença de muitos grupos ionizáveis garantem, maiores valores de solubilidade em água e menores valores de coeficiente de partição octanol-água (Log K_{ow}) comparado aos pesticidas, moléculas mais estudadas em comportamento ambiental. Sob diferentes condições de pH, se tornam neutras, catiônicas, aniônicas ou zwitteriônicas e ainda tem suas propriedades físico-químicas e biológicas alteradas, tais como log P_{ow}, comportamento de sorção, foto reatividade, atividade antibiótica e toxicidade (KÜMMERER, 2009; REGITANO; LEAL, 2010). Outra característica de complexidade, é a baixa metabolização ocorrida durante o tratamento infeccioso em humanos e animais. Até 90% da dose

administrada são excretadas na forma original ou pouco metabolizadas, condição que justifica a presença de porções remanescentes encontradas em ambientes terrestre e aquático, onde é possível pelas particularidades das moléculas se isentarem de efeitos imediatos de degradação biótica e abiótica e continuarem persistentes e biodisponíveis (SARMAH et al., 2006; KÜMMERER, 2009; REGITANO; LEAL, 2010; GAO et al., 2012a; PAN; CHU, 2017; FAO, 2017a), fatores que contribuem, dentre outros relacionados a ecotoxicidade e bioacúmulo (KÜMMERER, 2009; GAO et al., 2012a; CHEN et al., 2015; DENG et al., 2016; ZHANG et al., 2018), para a pressão seletiva e desenvolvimento da resistência microbiana e genes resistentes a antibióticos, duas preocupações de consequência de perda de eficácia dos compostos com impactos diretos na saúde pública e economia mundial (KÜMMERER, 2009; DOYLE et al., 2013; CHEN et al., 2015; SU et al., 2017; SANTOS; RAMOS, 2018).

A ocorrência dos resíduos na cadeia alimentar e seus efeitos de toxicidade (CAÑADA-CAÑADA et al., 2009; HANEKAMP; BAST, 2015; SONG et al., 2017; LIU, STEELE, MENG, 2017), reações alérgicas em indivíduos sensíveis (GBYLIK-SIKORSKA et al., 2015), além da possibilidade de consumo passível ser um potencial fator contribuinte do desenvolvimento da resistência microbiana (FERNANDEZ-TORRES et al., 2011; LIU, STEELE, MENG, 2017), as recomendações de ingestão diária (IDA) e limites máximos de resíduos permitidos (LMRs) estabelecidos em diferentes matrizes pelas agências reguladoras ou mesmo a não autorização de uso, governam o controle de tempo de carência após o emprego em práticas veterinárias e contribuem para saúde e segurança alimentar dos consumidores (QUESADA et al., 2013).

2.2.1 Antibióticos na carcinicultura

Bactérias e vírus são os principais patógenos responsáveis por mais de 80% dos surtos de doenças no camarão, quando comparados a fungos e parasitas (FLEGEL, 2012; TASSANAKAJON et al., 2018).

Modelos de técnicas de cultivo intensivo têm proporcionado bons rendimentos, porém alavancaram disseminação de enfermidades impactantes a produção mundial, principalmente pelas práticas de cultivo com alta densidade populacional nos viveiros e estresse ocasionado aos animais (LAI et al., 2015;

SOTO-RODRIGUEZ et al., 2015; FAO, 2016a; TASSANAKAJON et al., 2018). O uso de antibióticos para tratamento e prevenção das bacterioses é uma alternativa para o combate às perdas produtivas ocasionadas por doenças. Dentre as substâncias utilizadas destacam-se das classes das fluoroquinolonas, betalactâmicos, sulfonamidas, tetraciclina e anfenicóis (HOLMSTROM et al., 2003; GRASLUND; HOLMSTROM; WAHLSTROM, 2003; RIBEIRO et al., 2014; ROCHA et al., 2016). Em camarões a vacinação não é viabilizada pela ausência de um sistema imune adaptativo (FAO, 2018).

Ações imediatistas podem induzir os criadores a aumentar o uso dos antibióticos sem mensurar os impactos indiretos dessa atividade, merecendo enfoque das autoridades (FAO, 2016b).

As espécies de *Vibrio* são os patógenos bacterianos mais importantes e estão presentes naturalmente em ambientes estuarinos e áreas costeiras e apresentam também relevância à saúde humana. *Vibrio parahaemolyticus* (VPAHPND) que contém um plasmídeo de 69 kb portadores de genes binários da toxina Pir-like, PirvpA e PirvpB, é o agente causador de AHPND ou morte súbita, doença aguda de necrose hepatopancreática (AHPND), responsável por altos índices de mortalidade precoce em camarões (TASSANAKAJON et al., 2018; THITAMADEE et al., 2016). A vibriose da luminosidade causada por *Vibrio harveyi*, bactéria gram-negativa bioluminescente, é outra doença que acometem camarões, levam ao crescimento lento, perda de apetite, trazem luminosidade característica, ruptura do intestino e alta mortalidade nos viveiros (RICHARDS, 2014). Outras bactérias como *Pseudomonas*, *Edwardsiella* e *Aeromonas* são indesejáveis e relacionadas a septicemias hemorrágicas, sendo recomendado o tratamento com oxitetraciclina (BRASIL, 1999). Dentre as doenças causadas por vírus, a síndrome da mancha branca tem causado sérias conseqüências econômicas para a criação de camarões mundialmente (TASSANAKAJON et al., 2018; THITAMADEE et al., 2016).

O controle de qualidade da água na carcinicultura é fundamental para manutenção da saúde dos camarões. A presença de nitrogênio amoniacal é um dos parâmetros que prejudica a mucosa e flora intestinal de *Litopenaeus Vannamei*, órgão intimamente ligado com o sistema imunológico, a primeira linha de defesa contra invasores (DUAN et al., 2018; CHEN; HE, 2019). De modo geral, na aquicultura, muitos patógenos são oportunistas e podem permanecer indetectáveis até que algum estresse torne os animais suscetíveis à infecção (RICHARDS, 2014).

Além disso, não há antibióticos especificamente projetados para o setor e são utilizados produtos autorizados que foram desenvolvidos para outras áreas de medicina veterinária (SANTOS; RAMOS, 2018).

Os antibióticos são utilizados na aquicultura principalmente para fins profiláticos e tratamento metafilático e são introduzidos por meio de alimentação ou imersão direta em água. Evitam o surgimento e disseminação rápida da infecção (profilático) e cobrem ao mesmo tempo em totalidade os indivíduos doentes, saudáveis ou portadores (metafilático), razão pela qual as doses aplicadas podem ser proporcionalmente maiores comparadas as empregadas na pecuária, porém os níveis exatos são difíceis de mensurar e variam conforme o país e os sistemas empregados para controle (QUESADA et al., 2013; ELBASHIR et al., 2018; SANTOS; RAMOS, 2018).

Os resíduos de antibióticos representaram 28% das rejeições da União Européia e 20% das rejeições dos EUA às importações da aquicultura. O Vietnã, China, Tailândia, Bangladesh e Indonésia são os países cujos produtos da aquicultura são mais frequentemente rejeitados por esses motivos (FAO, 2017b). O quadro regulamentar relativo à utilização de antibióticos na aquicultura difere grandemente entre países e pouca ou nenhuma fiscalização está presente em muitos dos principais produtores, como na China (MARON; SMITH; NACHMAN, 2013; SANTOS; RAMOS, 2018).

Os alimentos representam uma das principais rotas de exposição a uma infinidade de substâncias químicas, muitas das quais são perigosas para os seres humanos e a vida selvagem (KING et al., 2017). Resíduos de antibióticos em produtos da aquicultura, dependendo da estabilidade molecular, permanecem por períodos prolongados nos tecidos dos animais (DONE et al., 2015; SANTOS; RAMOS, 2018).

Na carcinicultura, estudos tem apontado resíduos de antibióticos na água, em sedimentos e nos camarões, destacando-se os das classes das sulfonamidas, fluoroquinolonas, tetraciclina e anfenicóis (CHEN et al., 2015; LI et al., 2016; ZHANG et al., 2018; YUAN et al., 2019). Representantes das fluoroquinolonas (ciprofloxacina (CFX)) e tetraciclina (oxitetraciclina (OTC)), ambos considerados criticamente importantes segundo a OMS, são extensivamente usados em fazendas Vietnamitas criadoras de camarões (THUY et al., 2011; DOYLE et al., 2013).

O *Codex Alimentarius*, fórum internacional criado em 1963, para normatização do comércio de alimentos estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU), por ato da Organização para a Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial de Saúde (OMS), além de outras atribuições, trata de substâncias e produtos usados na elaboração de alimentos tais como aditivos, pesticidas, resíduos de medicamentos veterinários e outros contaminantes. Para camarões apenas tem estabelecido LMRs para oxitetraciclina (200 µg/Kg) e apresenta Sulfamidina (100 µg/Kg) sem declarar espécies (CODEX, 2015).

No Brasil, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC/Animal) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), fiscaliza as cadeias produtivas de alimentos (carnes, leite, mel, ovos e pescado) quanto aos níveis de resíduos de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde do consumidor, tais como resíduos de produtos de uso veterinário, de agrotóxicos e de contaminantes químicos (aflatoxinas, metais pesados, dioxinas). Tem uso proibido na carnicultura brasileira os antibióticos Nitrofurazona (SEM), Furazolidona (AOZ), Furaltadona (AMAZ), Nitrofurantoina (AHD) e Cloranfenicol. Para estes compostos o Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR) de referência para a análise varia de 0,3 a 1 µg/Kg. Outros antibióticos com limites de referência (LMR) estabelecidos para músculo de camarão de cultivo são tianfenicol e florfenicol (50 e 1000 µg/Kg, respectivamente), os da classe das tetraciclinas (100 µg/Kg cada composto); e da classe das sulfonamidas (soma igual a 100 µg/Kg). (BRASIL, 1999; 2017).

2.2.2 Antibióticos no ambiente

A boa solubilidade em água, conferida a maioria dos antibióticos, facilita a locomoção dos resíduos excretados entre ambientes terrestres e aquáticos, podendo inclusive atingir lençóis freáticos se possuírem alto poder de lixiviação, como é o caso das sulfonamidas. Mesmo aqueles que apresentam habilidade de sorção em solos e sedimentos, principalmente as tetraciclinas e fluoroquinolonas, no ambiente aquático podem ser uma fonte potencial dos antibióticos para coluna d'água sob perturbações desencadeadas por fenômenos físicos, químicos ou microbiológicos (GAO et al., 2012a; ZHOU-JL et al., 2012; LIANG et al., 2013; SHI et al., 2014; CHEN et al., 2015; PAN; CHU, 2016; LI et al., 2016; LI et al.,

2018b). A água é, portanto, um vetor de resíduos de antibióticos no ambiente, razão de muitos estudos terem se concentrado em ambientes aquáticos e suas matrizes (THUY et al., 2013; FAO, 2016a; 2016b; LI et al., 2016; SANTOS; RAMOS, 2018; LI et al., 2018b). Resíduos de antibióticos tem sido encontrado em matrizes fluviais e costeiras, lençóis freáticos e em alimentos da aquicultura em concentrações que vão de ng a μg (L^{-1} ou kg^{-1}) (THUY et al., 2013; CHEN et al., 2015; DONE; HALDEN, 2015; YAO et al., 2015; DENG et al., 2016; LI et al., 2016; MONTEIRO et al., 2016; SONG et al., 2017; LI et al., 2018b; ZHANG et al., 2018). Os resultados têm contribuído para elucidar rotas de origem, influências de fatores climáticos nas concentrações, prevalência de uso, persistência, toxicidade, bioacúmulo e necessidades de aperfeiçoamento de tecnologias para preservação e manutenção da qualidade da água.

O descarte contínuo no ambiente de compostos potencialmente tóxicos e persistentes devido à resistência aos processos degradativos, podem em função do acúmulo, resultar em ecotoxicidade e ainda carrear as consequências diretas ou indiretas para a cadeia alimentar, como os resíduos ou patógenos resistentes a antibióticos (KÜMMERER, 2009; CHEN et al., 2015; DENG et al., 2016; QUESADA et al., 2013; GBYLIK-SIKORSKA et al., 2015; SANTOS; RAMOS, 2018; LI et al., 2018b).

As estratégias de mitigação dos antibióticos no meio ambiente permanecem um desafio do ponto de vista econômico e ecológico para a atual e futuras gerações (KAESEBERG et al., 2018). Atualmente, os antibióticos estão incluídos no grupo de compostos considerados como poluentes ambientais emergentes, e permanecem unanimemente sem definição regulatória de LMRs (CARVALHO; SANTOS, 2016; MONTAGNER et al., 2017), no entanto, tem sido pauta em diversos fóruns (Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), Comissão do *Codex Alimentarius* e Assembleia Geral da Organização das Nações Unidas (ONU)), para definições de ações e metas para uso racional e implementação do conceito de Saúde Única, um trabalho multidisciplinar para promover a harmonia da saúde humana, animal e ambiental (DOYLE et al., 2013; SANTOS; RAMOS, 2018; BRASIL, 2019a).

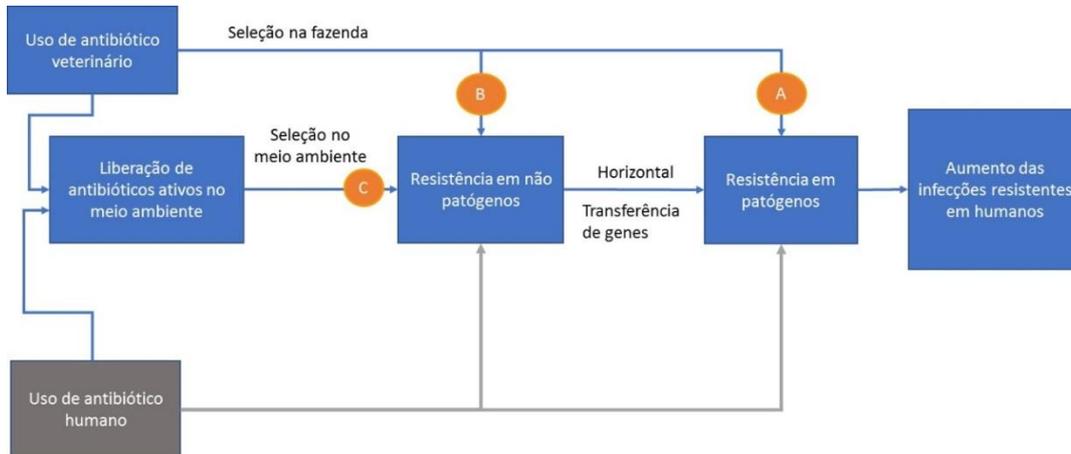
2.2.3 Resistência aos antibióticos

A evolução acelerada de patógenos bacterianos resistentes aos antibióticos e a concomitante circulação de genes resistentes, tem sido associada a pressão seletiva promovida pelo uso inadequado dos antibióticos nas medicina humana e principalmente veterinária, que vai desde o excesso ao mau uso, a doses subterapêuticas praticadas (SANTOS; RAMOS, 2018; FAO, 2016a). Um estudo realizado no Canadá de 2005 a 2007, demonstrou que a interrupção voluntária no uso de ceftiofur em incubadoras de ovos, reduziu a prevalência de resistência em *Salmonella* entérica sorovar Heidelberg em carcaças de frangos e amostras clínicas de humanos infectados em todo o país. (SCOTT et al., 2018)

Bactérias resistentes são um risco à produtividade de proteína animal, segurança alimentar e saúde da população. O tempo de tratamento de infecções por bactérias resistentes se prolongam, outros fármacos disponíveis são exigidos, geralmente mais caros e mais tóxicos, e em alguns casos, não respondem a nenhum dos antibióticos conhecidos (FAO, 2016a; ECDC, 2017; SANTOS; RAMOS, 2018). Segundo O'Neill (2016), cerca de 700.000 mortes humanas a cada ano no mundo estão relacionadas à resistência microbiana e até 2050 o prejuízo global está estimado em 100 trilhões de dólares.

Os mecanismos para o desenvolvimento da resistência bacteriana englobam mutações no DNA ou transferência horizontal de genes, que inclui conjugação com outras bactérias, transdução com bacteriófago e a absorção de DNA livre via transformação (SAPKOTA et al., 2008). No modelo conceitual desenvolvido por Singer e Williams-Nguyen (2014), observa-se as maneiras pelas quais o uso de antibióticos pode causar aumento de infecções resistentes em humanos (Figura 2).

Figura 2 – Modelo de cenários e maneiras pelas quais o uso de antibióticos veterinários pode causar aumento de infecções resistentes em humanos. A) Transmissão de patógenos resistentes a humanos via cadeia alimentar ou ambiente. B) Seleção de resistência não patogênica e transferência de genes de resistência a patógenos, levando a infecções mais resistentes em humanos. C) Compostos ativos liberados no ambiente, seleção e resistência em não-patógenos, e resistência transferida horizontalmente a patógenos como em B



Fonte: Adaptado Singer e Williams-Nguyen (2014).

O meio aquático oferece um forte poder dispersivo e de desenvolvimento de microrganismos patogênicos e genes resistentes a antibióticos, dessa forma, a aquicultura e suas ramificações pode representar uma ameaça em termos da rápida disseminação e transferência dos determinantes da resistência de animais aquáticos para animais terrestres, e para humanos, e vice-versa (SANTOS; RAMOS, 2018). Em sedimentos foram detectados uma série de genes responsáveis pela resistência às sulfonamidas, tetraciclinas, quinolonas, aminoglicosídeos e β -lactamase, além de alta identidade com plasmídeos de patógenos humanos, reafirmando uma estreita relação de contribuição ou aquisição de genes resistentes entre bactérias sedimentares e patogênicas (YANG et al., 2013; CZEKALSKI, GASCÓN, BURGMANN, 2014; CHEN et al., 2015; SANTOS; RAMOS, 2018).

Furushita et al. (2003), enfatizaram que genes que codificam resistência à tetraciclina em bactérias de peixes de viveiro e isolados clínicos no Japão exibiram uma alta similaridade, sugerindo que eles podem ter se originado da mesma fonte. Em outro estudo em laboratório observaram que houve viabilidade de transferência de resistência a tetraciclina por conjugação entre bactérias marinhas (*Photobacterium*, *Vibrio*, *Alteromonas* e *Pseudomonas*) e *Escherichia Coli*, bactéria associada ao intestino humano. Plasmídeos contendo diferentes genes resistentes a antimicrobianos (ARGs) foram transferidos *in vitro* com sucesso de peixes para

patógenos humanos, incluindo *Vibrio cholerae* e *V. parahaemolyticus* (SANTOS; RAMOS, 2018).

Cepas de bactérias patogênicas a camarões e à saúde humana (*V. parahaemolyticus*; *V. harveyi*, *V. cholerae*, *Salmonella spp.*) tem sido identificados no ambiente da carcinicultura do nordeste brasileiro com resistência ou mutirresistência aos antibióticos penicilina, ampicilina, cefalotina, florfenicol, nitrofurantopina, nitrofurantoína, oxitetraciclina e tetraciclina (CARVALHO et al., 2013; COSTA et al., 2015; ROCHA et al., 2016). Lai et al. (2015) também identificaram resistência a ampicillina (ABPC), estreptomicina (SM), sulfametoxazole (SMZ), fosfomicina (FOM) e benzamicina (BCM) em *V. parahaemolyticus* isolados na Tailândia e Vietnã. Carvalho et al. (2013), evidenciaram que antibióticos da classe dos nitrofurano estão banidos no Brasil, desde 2003, mas ainda demonstram atividade devido ligação com sedimentos que atrasam sua degradação.

2.3 Emprego da técnica de LC-MS/MS na determinação de antibióticos nas matrizes da carcinicultura

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série (LC-MS/MS) é a técnica analítica mais empregada na determinação de antibióticos em matrizes da aquicultura, proporciona análises simultâneas de multiclassas e multiresíduos e atinge os melhores limites de detecção e de quantificação comparado a outras técnicas analíticas (JUSTINO et al., 2016; SANTOS; RAMOS, 2016). Une a separação dos compostos pela cromatografia líquida e a identificação, confirmação e quantificação pelo emprego da espectrometria de massas em série (KRUBE et al., 2015a).

No espectrômetro de massas as moléculas eluídas do LC são fragmentadas pela fonte de ionização e os íons são separados no analisador de massas de acordo com a relação massa/carga (m/z), característica de cada molécula alvo, que por fim são carregados para o detector que os quantificam em abundância. A ionização pode ocorrer em modo positivo ou modo negativo a depender dos compostos, sendo, portanto, necessárias duas análises independentes, se na corrida analítica houver compostos com afinidades distintas pelos modos de ionização (KRUBE et al., 2015a; SANTOS; RAMOS, 2016).

Comparado a outros detectores empregados na cromatografia líquida, tais como, espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-vis) ou fluorescência, os espectrômetros de massas permitem uma identificação muito mais confiável dos compostos eluídos do LC, desde o emprego de resoluções nominais típicas de instrumentos triplo-quadrupolo e íon trap, especialmente se a detecção MS/MS é usada, até superiores, se instrumentos de alta resolução do tipo tempo de voo (do inglês *time-of-fly* (TOF) ou Orbitrap, forem escolhidos no acoplamento (LANÇAS, 2013; KRUIVE et al., 2015a).

Em MS/MS, íons precursores (MS1) são selecionados e submetidos em nova ionização para gerar íons produtos (MS2), trazendo informações de identificação e estrutura confiável do analito e maior relação sinal-ruído, importante para a detectabilidade e atendimento de LMRs definidos. Dentre os diferentes modos de aquisição e detecção da MS/MS, o modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), permite que os sinais de íons produto de múltiplos íons precursores sejam medidos e usados para quantificação de múltiplos analitos. Este modo de operação aumenta a seletividade do espectrômetro de massas e diminui a probabilidade de identificação de falsos positivos, já que os íons formados dos compostos que possam coeluir com mesma m/z dos íons dos analitos alvo, irão ser desprezados por não se sustentarem moleculamente na geração de íons produtos do interesse, portanto não serão detectados (LANÇAS, 2013; KRUIVE et al., 2015a).

O poder seletivo e habilidade de identificação de compostos pelo espectrômetro de massas não torna a cromatografia e etapas de preparo de amostras menos importantes, pois são cruciais para exatidão e precisão dos resultados muito influenciados pelo efeito matriz, fenômeno relacionado a complexidade da amostra em componentes que disputam por cargas, alteram a tensão superficial e formam núcleos (LI; KIJAK, 2011), responsáveis pela supressão/aumento da ionização que ocorrem em métodos de ionização em pressão atmosférica, dentre os quais está a ionização por eletronebulização (do inglês *electrospray ionization*, ESI), mais relevante e aplicada em análises de antibióticos de elevado peso molecular e termossensíveis (PRESTES et al., 2013; KRUIVE et al., 2015a).

Métodos de quantificação não necessariamente requerem um efeito matriz nulo (LI; KIJAK, 2011). No entanto, para contorná-lo em certa extensão, em métodos multiclasse e multiresíduos, o uso de padrão interno, construção de curva matrizada,

que incorpora todos os erros da extração, a redução da vazão, diluição da amostra, melhoramento da resolução cromatográfica ou limpeza dos extratos antes da análise, são práticas recomendadas, porém ainda sujeitas as dificuldades impostas por uma ampla diversidade de particularidades em propriedades físico-químicas dos analitos (LI; KIJAK, 2011; ZHOU-JL et al., 2012; FEDOROVA et al., 2014). O uso de padrões internos, especialmente padrões isotópicos, tem alto custo e nem sempre estão disponíveis para o uso proposto (FEDOROVA et al., 2014).

O preparo de amostras com intuito de estocagem, concentração, extração e isolamento dos analitos de interesse, é etapa crucial para o sucesso em análises de matrizes ambientais e alimentares. A extração consiste da remoção do analito da matriz, enquanto o isolamento consiste da eliminação de interferentes. As propriedades físico-químicas da matriz e dos analitos em estudo devem ser considerados na definição da melhor técnica analítica para obtenção de boas recuperações (JARDIM, 2010; FERNANDEZ-TORRES et al., 2011; ZHOU-LJ et al., 2012; PRESTES et al., 2013; QUESADA et al., 2013; PETROVIC, 2014; ZHAO et al., 2016; CARVALHO; SANTOS, 2016; SERRA-COMPTE et al., 2017; ZHANG et al., 2018). Usualmente englobam etapas de extração, eliminação de impurezas, concentração, ajustes de condições (por exemplo, pH) e ajuste de volume previamente à análise cromatográfica.

O uso da técnica de extração em fase sólida (SPE) é difundida em análises em que as amostras se encontram na forma líquida, mas também pode ser usada para amostras sólida se forem pré-extraídas com solventes. Na SPE a interação da amostra com uma fase estacionária adsorvente depositada numa coluna aberta ou cartucho, tem por finalidade concentrar os analitos de interesse ou isolá-los dos interferentes da matriz, segundo a interação que o material irá promover. Na concentração os analitos são retidos no cartucho e são removidos seletivamente pela ação de um solvente ideal puro ou combinado a outros solventes ou reagentes (JARDIM, 2010; HONG et al., 2015). No isolamento da matriz, o objetivo é inverso (JARDIM, 2010; CARVALHO; SANTOS, 2016). Cartuchos Oasis HLB mostraram maior robustez em recuperação e reprodutibilidade para compostos polares e não-polares por apresentar os polímeros divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona, unidades lipofílicas e hidrofílicas, trabalhando na faixa de pH de 1 a 14 e não possuem grupos de silanóis livres, associados a ligações irreversíveis. Portanto, esse sorvente pode extrair analitos ácidos, neutros e básicos numa ampla faixa de pH,

incluindo pH neutro. (SEIFRTOVÁ et al., 2009; WEI et al., 2014; KIM et al., 2018). O SPE contorna os problemas de baixa concentração encontrados em matrizes ambientais e seu emprego já em coletas de águas, principalmente em locais distantes do laboratório, tem facilitado o transporte e armazenamento das amostras e subsequente análise (SEIFRTOVÁ et al., 2009; JARDIM, 2010; LLORCA et al., 2014)

Em água a filtragem da amostra e acidificação previamente a extração em SPE contribuem para purificação e melhor disponibilização dos analitos alvo a interação com o material SPE adsorvente, aumentando a recuperação nas etapas subsequentes a eluição (GROS et al. 2013; GBYLIK-SIKORSKA et al., 2015; KIM et al., 2018). São mais raros, mas há trabalhos em análises de multiclases e multiresíduos de antibióticos em água de rio e efluentes em que a acidificação prévia das amostras não ocorreram e os resultados de recuperação dos compostos em maioria foram satisfatórios (MCCLURE; WONG, 2007; LI et al., 2012; GAO et al., 2012b; KIM et al., 2018).

Comparada a extração líquido-líquido a SPE oferece vantagens em seletividade, especificidade e reprodutibilidade, menor consumo de solventes, rapidez, fácil operação, diferentes opções para materiais adsorventes e possibilidade de automação. A SPE pode ser conduzida nos modos *off line* e *on line*. As características que os diferem é a forma com que ocorre o pré-tratamento e transferências das amostras para o injetor cromatográfico. No modo *off line* o pré-tratamento das amostras e transferência para o injetor cromatográfico é manual. No modo *on-line*, o equipamento incorpora os dispositivos para extração, *clean-up* e eluição da amostra para a coluna analítica, numa operação sequencial e automatizada. A automação pela SPE-*on line* melhora o tempo de análises dispensando etapas de evaporação e reconstituição das amostras, reduz as quantias de amostras necessárias para análises, reduz os riscos de perdas e contaminação presentes nessas etapas e, se alia a química verde pela redução em consumo de solventes orgânicos (JARDIM, 2010; MONTEIRO et al., 2016; KIM et al., 2018). Para o sistema em modo *on line*, é necessário um bombeamento de fases móveis que intercale os momentos de carregamento da amostra na coluna de SPE e outro que realize a eluição dos analitos para a coluna analítica. Feitos em gradientes, pode-se empregar de 4 a 5 fases móveis com vazões distintas,

a depender do escopo analítico a ser atendido (MONTEIRO et al., 2016; LI; KIJAK, 2011).

Métodos multiclassas e multirresíduos robustos que permitam o preparo e análise de amostras de forma unificada para um grande número de matrizes tem sido tendência (FEDOROVA et al., 2014; PRESTES et al., 2013). Pearce et al. (2009); Dufresne et al. (2007); Fedorova et al. (2014); Serra-Compte et al. (2017), desenvolveram método genérico que permitiu a determinação simultânea de resíduos de antibióticos em músculos de camarão, salmon, truta, tilápia e carpa, moluscos e mexilhões. Já Gros et al. (2013) e Zhou-JL et al. (2012), focaram em matrizes aquosas com escopo de análises para água de rio, efluente hospitalar, efluente doméstico e água marinha.

O número de etapas quando presentes em menor número oferece além de agilidade na obtenção dos resultados, redução de custos e redução nas fontes de erros (GROS et al., 2013; PRESTES et al., 2013).

Em sedimentos a liofilização e padronização da granulometria das partículas por peneiramento são as etapas iniciais do preparo de amostras. A extração de antibióticos ocorre via extração sólido-líquido com acetonitrila em meio ácido tamponado (pH 3-4), seguido de banho em ultrassom e centrifugação, etapas repetidas de 2 a 3 vezes por amostra. Após combinação dos extratos, é feita a concentração, ajuste em volume e adição de agentes quelantes, seguido de limpeza e/ou concentração em SPE (LI et al., 2018a; ZHANG et al., 2018; LIU et al., 2016; CHEN et al., 2015; ZHOU-LJ et al., 2012). A etapa de limpeza visa a remoção de material orgânico, abundante em sedimentos (ZHAO et al., 2016; ZHOU-LJ et al., 2012). Chen e Zhou (2014) na determinação de 4 classes de 20 antibióticos em sedimentos de rio, eliminaram a etapa de limpeza dos extratos, fazendo a injeção cromatográfica logo após a concentração e ajuste de volume com água. Shi et al. (2014), em trabalho similar com sedimentos de estuários e região costeira, eliminaram a etapa final de limpeza do extrato e acrescentaram sulfato de sódio para remoção de água antes da centrifugação.

A extração de multiclassas e multiresíduos de antibióticos em músculo de camarão, tem sido realizada em meio a solventes orgânicos, geralmente acetonitrila acidificada com ácido fórmico, capazes de promover a precipitação protéica e minimização da coextração de lipídeos, além de beneficiar as tetraciclinas (SAXENA et al., 2018). Os procedimentos de extração, usualmente englobam

técnicas de extração líquido-sólido (LSE) e Quechers sozinhas, ou podem ainda estar em combinação, com limpeza do extrato pela extração em fase sólida (SPE) ou extração em fase sólida dispersiva (D-SPE) (DUFRESNE et al., 2007; VILLAR-PULIDO et al., 2011; LI; KIJAK, 2011). O uso de n-hexano é uma estratégia para limpeza da amostra na remoção de lipídeos, grandes impactantes no desempenho analítico (SAXENA et al., 2018). Na tendência por técnicas rápidas de extração e limpeza, Monteiro et al. (2016), num trabalho pioneiro, obtiveram resultados positivos com cartuchos Captiva de 3 mL, composto de polivinilidifluoreto e polipropileno, na remoção de interferentes protéicos e fosfolipídicos remanescentes da combinação extratora de acetonitrila e água em análise de antibióticos em músculo de tilápias (*Oreochromus niloticus*).

Li e Kijak (2011) mostram a importância da etapa de homogeneização de amostras na determinação de multirésíduos de antibióticos em camarão. Os índices de recuperação e precisão foram melhorados pela ação do solvente entre os domínios intersticiais, celular e subcelulares existentes no tecido muscular. O emprego do SPE *on line* contribuiu para limpeza do extrato, eliminando sais inorgânicos, gorduras, proteínas e outras substâncias endógenas (JUSTINO et al., 2016).

2.4 Validação de métodos analíticos

A validação de métodos analíticos tem por objetivo confirmar se determinado método proposto é apropriado ao uso pretendido e se os resultados gerados apresentam confiabilidade. O procedimento se aplica a métodos normalizados ou modificados, e aos desenvolvidos pelo próprio laboratório. Uma série de experimentos, incluindo tratamento estatístico dos dados, deve estar prevista no planejamento de validação (INMETRO, 2018a; KRUIVE et al., 2015a).

Há diferentes guias de validação disponíveis para métodos quantitativos, entretanto, são muito particulares os critérios de desempenho requeridos e a forma com que são conduzidos os experimentos de verificação em cada um. Além disso, os guias estão direcionados muitas vezes para seguimentos específicos, influenciando a busca por outras fontes decisórias para análise crítica dos resultados, valendo a própria experiência do analista ou laboratório, a trabalhos semelhantes presentes em literaturas científicas. Os parâmetros de seletividade,

linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robutez são os mais comumente empregados em validação de métodos cromatográficos (RIBANI, 2004; CHANDRAN; SINGH, 2007; BONFILIO et al., 2012; KRUIVE et al., 2015a). Estudos de estabilidade também estão presentes entre os parâmetros de validação e são importantes para checar se tempo e temperatura nas condições de preparo ou armazenamento das amostras influenciam a estabilidade dos padrões analíticos e das amostras (RIBANI, 2004).

Cada parâmetro testado apresenta uma característica chave indispensável a ser atingida. A seletividade é o parâmetro que demonstra a assertividade do método em quantificar de forma inequívoca os analitos de interesse na presença de outros analitos ou potenciais interferentes. O uso de amostras em branco e branco fortificado são exemplos de experimentos que possibilitam checar se os componentes da matriz apresentam picos dentro do mesmo tempo de retenção dos analitos. Para atendimento da linearidade os resultados gerados numa determinada faixa da curva de calibração devem ser diretamente proporcionais as concentrações dos analitos presentes na amostra. Um coeficiente de correlação (r^2) entre 0,98 a 1,00 é um indicador esperado para linearidade. Os parâmetros de exatidão e precisão podem ser determinados por ensaios de recuperação em amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito. Os resultados são expressos respectivamente em porcentagem e pelo coeficiente de variação (CV). A exatidão e precisão fornecem informações sobre quão próximo os resultados estão de um valor de referência e quão semelhantes são as respostas na repetibilidade das análises, perante as variações normais que ocorrem em trabalho. A recuperação entre 70-120% e CV até 20% são valores recomendados para os parâmetros. Diferente do limite de quantificação (LQ), o limite de detecção (LD) expressa a menor quantidade do analito que o método tem poder de reconhecer na amostra mesmo sem a capacidade de quantificá-lo. O LD e LQ podem ser determinados por diferentes experimentos, incluindo método visual, relação sinal/ruído, parâmetros da curva analítica e do desvio padrão. O mais comumente empregado é de relação sinal/ruído, 3:1 para LD e 10:1 para LQ. O parâmetro de robutez também tem os resultados verificados pelo CV de até 20% e avalia quais os limites para mudanças deliberadas em pontos críticos do método que influenciam os resultados, tais como coluna cromatográfica, fases móveis e temperatura. É um parâmetro questionável, pois é mais trabalhado na etapa de desenvolvimento de métodos. O parâmetro de

estabilidade é avaliado por experimentos com soluções-padrão ou fortificação de amostras onde se compara resultados de amostras recém-preparadas com as submetidas a armazenamento ou condições específicas exigidas pela rotina de laboratório, por exemplo, ciclos de congelamento e descongelamento devido a reanálises, armazenamento de extratos e equipamentos inoperantes. O critério de aceitação é variável, podendo ir de 10 a 20% (PIMENTEL, 1996; RIBANI, 2004; RIBEIRO; FERREIRA, 2008; CASSIANO et al., 2009; HILLEBRAND et al., 2013; KRUIVE et al., 2015a; JUSTINO et al., 2016; INMETRO, 2018a).

Dentre os guias de validação mais conhecidos, estão o do ICH (*International Conference on Harmonisation*), European Commission Decision (2002/657/EC), SANTE 11813/2017, FDA (*The United States Food and Drug Agency*), EMA (*European Medicines Agency*), IUPAC (*Internacional Union of Pure and Applied Chemistry*), AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) e Eurachem (*A Focus for Analytical Chemistry in Europe*) (INMETRO, 2018a; KRUIVE et al., 2015a). No Brasil os parâmetros e critérios de desempenho dos diferentes guias foram internalizados pelo MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento), ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e INMETRO/CGCRE (INMETRO/Coordenação Geral de Acreditação).

Mesmo validado, é conveniente em análises de rotina que o método seja checado com amostras de controle de qualidade para atestar a manutenção e regularidade dos parâmetros de desempenho, inclusive se está havendo coeluição ou contaminação (JUSTINO et al., 2016; KRUIVE et al., 2015b). Amostras em branco de solvente, branco de matriz e matriz fortificada intercaladas com as amostras reais, alvo das análises, são exemplos de controle de qualidade empregados em rotina analítica (MONTEIRO et al., 2016). Outras práticas envolvem comparação de resultados encontrados nos mesmos itens ou em itens similares de ensaios e são conhecidas por comparação intralaboratorial, quando realizada no mesmo laboratório, e comparação interlaboratorial, quando as comparações dos resultados são realizadas entre laboratórios, incluindo ensaios de proficiência (INMETRO, 2018b).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a ocorrência de resíduos dos antibióticos clortetraciclina (CTC), oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC), sulfadimetoxina (SDM), sulfametazina (SMZ), sulfatizol (STZ), ciprofloxacina (CFX), enrofloxacina (EFX), norfloxacina (NFX), sarafloxacina (SAR), cloranfenicol (CAP) e florfenicol (FF), em camarão (*Litopenaeus vannamei*), água e sedimentos, procedentes de viveiros de cultivo em fase de despesca, de fazendas criadoras de camarão do estado do Rio Grande do Norte, nordeste brasileiro, fazendo uso da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com fonte de ionização *electrospray* (LC-ESI-MS/MS).

3.2 Objetivos específicos

Validar métodos cromatográficos para determinação simultânea de multiclassas e multirésíduos de antibióticos em camarão (*Litopenaeus vannamei*), água e sedimentos;

Avaliar a estabilidade de longa duração dos antibióticos nas diferentes matrizes;

Determinar a ocorrência dos resíduos de antibióticos em água, sedimentos e camarão procedentes de viveiros de cultivo em fase de despesca;

Determinar a ocorrência e distribuição espacial dos resíduos de antibióticos em água e sedimentos à montante e à jusante dos viveiros de cultivo de camarão selecionados em fase de despesca;

Avaliar parâmetros físico-químicos da qualidade da água nos pontos de coleta;

Avaliar a ocorrência dos antibióticos NFX, EFX, CFX e SAR, nas diferentes matrizes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos e instrumentação

Para o desenvolvimento do estudo foram utilizados balança analítica SHIMADZU (AUW220D); balança semi-analítica SHIMADZU (BL 3200H); bomba de Vácuo Vacuubrand (MZ 2C NT); centrífuga Hitachi (CF16RXII); coluna analítica Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 3 mm, 3,5 µm); coluna semi-preparativa Agilent Zorbax SB-C8-80 (9,4 x 15 mm, 7 µm); concentrador Uniscience (Turbo Vap® LV); cromatógrafo líquido Agilent 1200 (equipado com bomba quaternária; (G1311C); bomba binária (G1312A); injetor automático com adaptação para volume até 900 µL (1260 Infinity G1329); desgaseificador (G4225A); forno de colunas (G1316A) e válvula de 10 portas); espectrômetro de Massas Triplo Quadrupólo Agilent 6410; sistema de aquisição de dados Agilent Mass Hunter); liofilizador CHRIST® (Alpha 2-4 LD *plus*); liquidificador Oster® (6826-017) com copo de vidro; manifold Supelco Visiprep DL™ (5-7044); peneira Granutest® *mesh* 60; pHmetro Tecnal (TEC-4MP); rotaevaporador Buchi (R-215); sonda multiparâmetros Aquaread (AP 5000 AgSolv); ultrassom Branson (2510R-DTH); ultraturrax Marconi (MA 102) e vortex Uniscience (Biovortex V1). Todos os equipamentos e instrumentos foram disponibilizados pelo Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

4.2 Solventes e Reagentes

Foram utilizados metanol (AppliChem Panreac) e acetonitrila (JT Baker) de grau cromatográfico; ácido cítrico monohidratado (Synth); ácido clorídrico (Merck); ácido fórmico (Merck); ácido ortofosfórico (Mallinckrodt); citrato de sódio di-hidratado (Merck); hidróxido de amônio (Caledon); hidróxido de sódio (Synth) e Na₂EDTA (Sigma-Aldrich), todos reagentes de grau analítico. A água ultra-pura foi produzida via sistema Millipore (Direct Q-3 U/V). Os padrões analíticos dos antibióticos apresentaram pureza de 95,8% a 99,9%. Foram adquiridos da Sigma-Aldrich os padrões de oxitetraciclina 95,8% (OTC); tetraciclina 97,5% (TC),

ciprofloxacina >98% (CFX), enrofloxacin >98% (EFX), sarafloxacina 97,3% (SAR), norfloxacina 99% (NFX), sulfametazina 99,5% (SMZ), sulfatiazol 99,9% (STZ) e florfenicol 98% (FF). Sulfadimetoxina 99,5% (SDM) foi adquirido da ChemService. Cloranfenicol 98,5% (CAP) e clortetraciclina 99% (CTC) foram adquiridos do Dr. Ehrenstorfer. A Tabela 1 apresenta a classe, o composto, CAS *number*, limites máximo de resíduos (LMR) em camarão de cultivo (PNCRC/Animal-MAPA), (BRASIL, 2017), fórmula molecular, massa molar e pKa dos antibióticos em estudo.

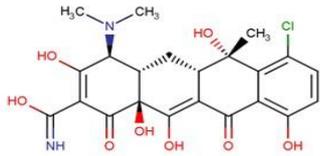
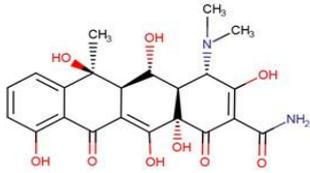
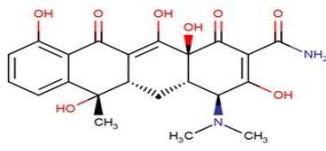
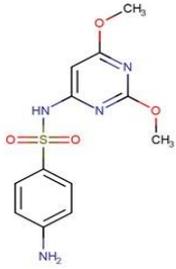
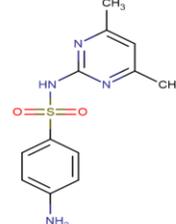
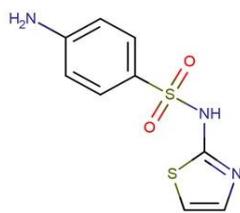
4.3 Preparo de soluções padrões

Foram preparadas individualmente soluções estoque de 10 mL em concentração final de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada padrão analítico, com as correções de pureza dos sais consideradas na pesagem, em balança analítica.

Os padrões analíticos da classe das fluoroquinolonas foram dissolvidos em 0,5 mL de NaOH 1 M e 9,5 mL de metanol. As tetraciclinas e sulfonamidas foram dissolvidas em 10 mL de metanol e os anfenicóis em acetonitrila.

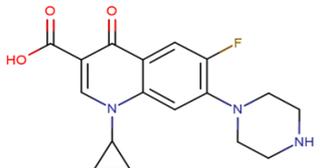
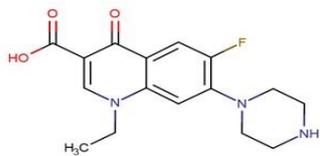
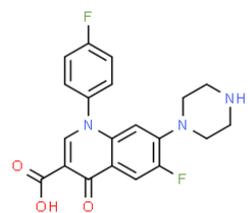
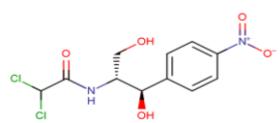
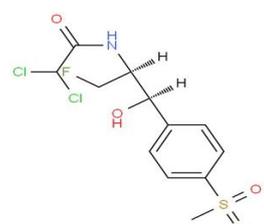
A partir de 100 μL de cada solução estoque de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foi preparado uma solução mix de 10 mL diluída em metanol, contendo todos antibióticos em concentração final de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que foi base para os trabalhos de validação e controles analíticos e preparo diário de outras soluções de concentração menor. Todas as soluções estoque e mix foram mantidas em freezer a temperatura de -20 °C.

Tabela 1 - Antibióticos estudados, classe, CAS number, limites máximos de resíduo (LMR) em camarão de cultivo, formula molecular, massa molar e pKa

| CLASSE | Antibióticos | CAS | LMR* ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | Fórmula Molecular | Massa Molar (g mol^{-1}) | pKa |
|--------------|------------------------|----------|-----------------------------------|--|--|-------------|
| Tetraciclina | Clortetraciclina (CTC) | 57-62-5 | 100 |  | 478,88 | 4,5 a 25°C |
| | Oxitetraciclina (OTC) | 79-57-2 | 100 |  | 460,43 | 3,27 a 25°C |
| | Tetraciclina (TC) | 60-54-8 | 100 |  | 444,43 | 3,3 a 25°C |
| Sulfonamidas | Sulfadimetoxina (SDM) | 122-11-2 | 100 ¹ |  | 310,33 | 5,54 a 25°C |
| | Sulfametazina (SMZ) | 57-68-1 | 100 ¹ |  | 278,33 | 7,59 |
| | Sulfatiazol (STZ) | 72-14-0 | 100 ¹ |  | 255,31 | 7,2 |

continua

continuação

| CLASSE | Antibióticos | CAS | LMR* ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | Fórmula Molecular | Massa Molar (g mol^{-1}) | pKa |
|------------------|----------------------|------------|-----------------------------------|--|--|--------------|
| Fluoroquinolonas | Ciprofloxacina (CFX) | 85721-33-1 | ² |  | 331,34 | 6,09 |
| | Enrofloxacin (EFX) | 93106-60-6 | ² |  | 359,4 | 6,21 |
| | Norfloxacina (NFX) | 70458-96-7 | ³ |  | 319,33 | 6,26 8,75 |
| | Sarafloxacina (SAR) | 98105-99-8 | ⁴ |  | 385,36 | 6,5 |
| Anfenicóis | Cloranfenicol (CAP) | 56-75-7 | 0,3 |  | 323,13 | 7,49 2,8 |
| | Florfenicol (FF) | 73231-34-2 | 1000 |  | 358,21 | 9 |

* LMR = Limite Máximo de Resíduo adotado para músculo de camarão de cultivo; ¹ Valor de LMR considerado como soma de todas as sulfonamidas monitoradas; ² Antibióticos exclusivos para peixes de cultivo. LMR = Soma $100 \mu\text{g kg}^{-1}$; ³ Antibiótico não presente no PNCRC/Animal-MAPA; ⁴ Antibiótico exclusivo para peixes de cultivo. LMR = $30 \mu\text{g kg}^{-1}$; Fontes: BRASIL, 2017; Jiang et al. (2017); <https://www.drugbank.ca>; <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/atoz.htm>; <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure>

4.4 Coleta e preparo das amostras

4.4.1 Pontos de coleta

Amostras de camarões (*Litopenaeus vannamei*), água e sedimentos foram coletados em 5 fazendas produtoras de camarões, em dezembro de 2017, na região litorânea do estado do Rio Grande do Norte, RN, Brasil (Figura 3). As fazendas foram selecionadas perante modelos distintos de produção e infraestrutura e com viveiros de camarões em estágio de despesca. As fazendas estão localizadas a Lat: S 05°04.7285 Lon: W 035°54.5126 – Fazenda 1; Lat: S 05°39.9486 Lon: W 035°14.6041 - Fazenda 2; Lat: S 05°39.9082 Lon: W 035°13.8279 - Fazenda 3; Lat: S 06°12.3739 Lon W 035°09.3733 - Fazenda 4 – e Lat: S 06°12.7837 Lon: W 035°07.1355 – Fazenda 5. Todos os pontos de coleta foram georeferenciados pelo sistema de posicionamento global (GPS) presente na sonda multiparâmetros Aquaread (AP 5000 AgSolv), utilizada durante os ensaios de campo para checagem da qualidade da água.

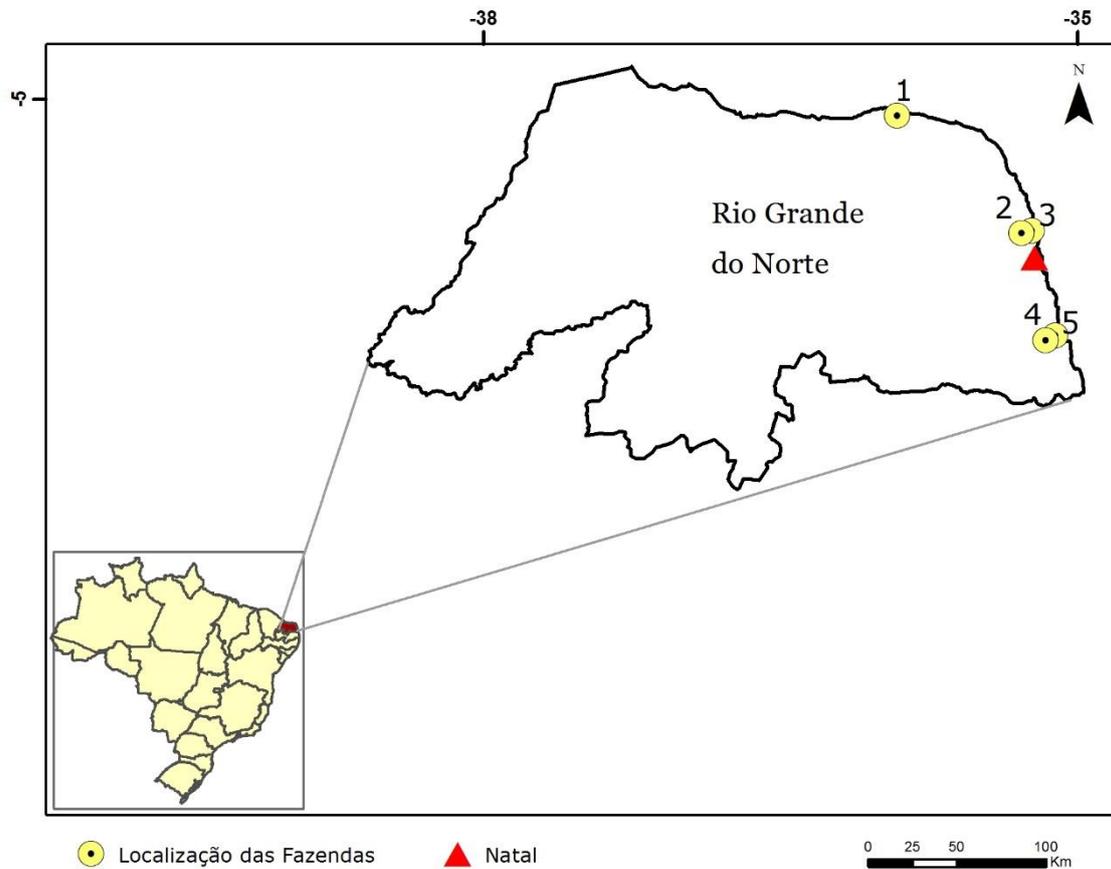
4.4.2 Caracterização das Fazendas

As fazendas foram caracterizadas perante o sistema de produção, densidade de povoamento dos viveiros de engorda e pela infraestrutura para captação e drenagem de água.

4.4.3 Coleta das amostras

Um viveiro de camarão em fase de despesca foi selecionado em cada fazenda para coleta simultânea das 3 matrizes.

Figura 3 - Campo de amostragem contendo a localização e região das fazendas produtoras de camarão no estado do Rio Grande do Norte, RN, Brasil



Fonte: Software arcGIZ, versão 10.5.1, (2017)

Foram também coletadas amostras de água e sedimentos a montante (lagoa ou canal de captação de água) e a jusante dos viveiros (lagoa de sedimentação ou canal de drenagem) para o estudo da distribuição espacial dos antibióticos nas fazendas. Todas as amostras foram coletadas em triplicata ($n = 3$). Das triplicatas de sedimentos e camarões foram criadas amostras compostas.

Durante a coleta foram checados com a sonda multiparâmetros, a 20 cm da superfície, parâmetros físico-químicos de qualidade da água, como a temperatura, pH, turbidez, potencial de oxirredução (ORP), oxigênio dissolvido (OD), condutividade (CE), sólidos totais dissolvidos (STD) e salinidade (SAL).

As amostras de água (1L) foram coletadas, a 20 cm da superfície, em sacos plásticos de polietileno de baixa densidade com fechamento hermético, foram filtradas pela ação de gravidade em filtro 100% celulósico (Melitta® 102) e em seguida concentradas manualmente em cartuchos SPE HLB Oasis (500 mg, 6 mL;

Waters), conectados a seringas de 60 mL (BD Plastipak™) com agulha e batoque, a vazão de 10 mL min⁻¹ e pré-condicionados com 10 mL de metanol e 10 mL de água ultrapura. Os cartuchos foram secos com auxílio das seringas e protegidos com filme de PVC.

Os sedimentos (300 g amostra composta) foram coletados manualmente em 3 pontos distintos por amostra, a (0-5 cm) de profundidade. A coleta iniciou na direção da área mais rasa dos viveiros para a profunda. A água remanescente foi escoada e os sedimentos foram armazenados em sacos plásticos de polietileno de baixa densidade com fechamento hermético.

As amostras de camarão (500 g amostra composta) foram coletadas com rede de pesca e transferidas para os sacos plásticos de polietileno de baixa densidade com fechamento hermético.

Todas as amostras em trânsito foram mantidas refrigeradas em isopor com gelo e em freezer a -20°C até serem transferidas para o Laboratório de Ecotoxicologia, CENA/USP, em Piracicaba/SP.

4.4.4 Preparo das amostras

No Laboratório de Ecotoxicologia, CENA/USP, as amostras de água superficial acondicionadas nos cartuchos SPE HLB Oasis (500 mg, 6 mL; Waters), foram mantidas em freezer -20 °C. As amostras de sedimentos foram transferidas para recipientes de polietileno de alta densidade, em seguida foram secas a baixas temperaturas em liofilizador, tiveram a granulometria padronizada em peneira (*mesh* 60) e foram armazenadas em freezer -20 °C.

Os camarões tiveram a carapaça, cefalotórax, calda, patas e intestino removidos antes da homogeneização do tecido muscular, realizada em liquidificador com copo de vidro. Foram calculados os pesos médios dos camarões íntegros e dos tecidos musculares obtidos, a partir de 10 camarões selecionados aleatoriamente de cada fazenda. O material homogeneizado foi armazenado em freezer -20°C em sacos plásticos de polietileno de baixa densidade com fechamento hermético.

4.5 Procedimento analítico

A extração e determinação dos 12 resíduos de antibióticos, nas respectivas matrizes, seguiram como referência os métodos desenvolvidos por Monteiro et al. (2015; 2016) para a determinação dos resíduos alvo em água e sedimentos de rio e músculo de tilápias (*Oreochromus niloticus*). As adaptações realizadas nas marchas analíticas tiveram ênfase na quantificação dos resíduos por padronização externa e na metodologia para a matriz água. Todas as amostras reais foram analisadas em triplicata ($n = 3$).

4.5.1 Extração dos antibióticos em amostras de água

A extração dos antibióticos nos cartuchos HLB Oasis (500 mg, 6 mL; Waters) foi otimizada e ocorreu via sistema SPE *off line* com uso de manifold e bomba de vácuo. Antes da eluição dos analitos, os cartuchos foram lavados com 6 mL de água deionizada acidificada em pH 2,5 (HCl 0,01N), (TLILI et al., 2016), e em seguida foram secos pela ação do vácuo por 30 minutos. A eluição ocorreu na sequência com 10 mL de Metanol em 5% de NH_4OH (LI et al., 2012; GAO et al., 2012b). Nas duas etapas que envolveram a lavagem e extração, os volumes dos eluentes foram divididos em 2 carregamentos com vazão ajustada para 5 mL min^{-1} . O eluato foi recolhido em tubos de vidro de 12 mL e evaporados até secagem completa em fluxo suave de N_2 e banho a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ em concentrador. As amostras foram reconstituídas em 1 mL de solução metanol e água deionizada (20:80, v/v) com 0,1% de ácido fórmico (HONG et al., 2015) e foram transferidas para *vial* de injeção no LC-MS/MS.

4.5.2 Extração dos antibióticos em amostras de sedimentos

Em balança analítica, 2 g de sedimentos liofilizados foram pesados em tubos de teflon de 50 mL com tampas de rosca. Em seguida, foram adicionados 10 mL de acetonitrila e 10 mL de tampão de citrato pH 3, preparado com a dissolução, em 1 L de água ultrapura, de 57,4 g de ácido cítrico monohidratado e 17,6 g de citrato de sódio di-hidratado, pesados em balança semi-analítica. Os tubos foram agitados por 1 min em vortex e mantidos em ultrassom por 15 min. Após seguiram para

centrifugação a 1400 g por 10 min e o sobrenadante foi transferido para balão de vidro de 250 mL com fundo redondo contendo 0,2 g de Na₂EDTA. O procedimento de extração foi repetido 3 vezes em cada amostra e os sobrenadantes foram adicionados no mesmo balão. O extrato final foi concentrado em rotaevaporador a 40 °C durante aproximadamente 20 minutos até remoção de 95% da acetonitrila. Em seguida, o volume final do extrato aquoso foi ajustado para 40 mL em proveta com adição de água ultrapura. Os analitos em uma alíquota de 6 mL desse extrato foram isolados em cartuchos SPE Strata SAX (500 mg, 6 mL; Phenomenex) acoplados em sistema manifold com bomba de vácuo, já pré-condicionados com 10 mL de metanol e 10 mL de água ultrapura, e secos pela ação do vácuo, durante 30 minutos antes do carregamento da amostra. A vazão do sistema foi ajustada para 5 mL min⁻¹. Os eluatos foram coletados em tubo de vidro de 12 mL e foram filtrados para *vials* de 6 mL, onde seguiram para injeção e concentração no sistema SPE-LC-MS/MS *on line*. Para filtragem dos eluatos foram utilizados filtros de teflon de 0,22 µm de poro (Agilent) acoplados às seringas descartáveis (BD PlastipakTM).

4.5.3 Extração dos antibióticos em amostras de camarão

Em 5 g de músculo de camarão homogeneizado, pesados em balança analítica em tubos de teflon de 50 mL com tampas de rosca, foram adicionados 1 mL de solução de 0,1 M Na₂EDTA e 24 mL de solução de acetonitrila e água (70:30, v/v) com 0,1% de ácido fórmico. Em equipamento ultraturrax, os tubos contendo a mistura foram homogeneizados durante 5 min, em velocidade baixa, e após seguiram para centrifugação a 1400 g por 5 min. Numa alíquota de 500 µL do sobrenadante os analitos foram isolados em cartuchos Captiva ND (Agilent), acoplados em sistema manifold com bomba de vácuo e foram transferidos diretamente para *vials* de 2 mL, onde seguiram para injeção no LC-MS/MS.

4.6 Determinação dos antibióticos pela técnica de LC-MS/MS

Para determinação e quantificação dos antibióticos foi utilizado da Agilent Technologies, cromatógrafo líquido 1200, acoplado a espectrômetro de massas 6410, com fonte de ionização *electrospray*, detector triplo-quadrupolo (MS/MS) e *software* Mass Hunter Optimizer. Para análise dos antibióticos em sedimentos no

SPE-LC-MS/MS *on line* foi utilizado a coluna semi-preparativa Agilent Zorbax SB-C8-80 (9,4 x 15 mm, 7 μm). Para separação cromatográfica nas três matrizes, foi utilizada a coluna analítica Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 3 mm, 3,5 μm).

A fonte de ionização foi operada no modo positivo (ESI^+), com exceção apenas do florfenicol (FF), analisado separadamente no modo negativo (ESI^-). A pureza do gás nitrogênio para o nebulizador foi 99,99% e para câmara de colisão 99,9999%.

Os procedimentos em (MS/MS) para identificação e confirmação dos antibióticos envolveram tempo de retenção e duas transições no modo MRM. Os íons produto mais abundantes e que não mostraram evidências de interferentes cromatográficos e apresentaram a maior razão sinal-ruído foram selecionados para quantificação.

As seleções de transição de massas, bem como a otimização dos parâmetros para cada um dos antibióticos foram trabalhados na íntegra conforme proposto por Monteiro et al. (2015;2016). Os detalhes, incluindo o tempo de retenção, estão apresentadas na Tabela 2.

Para as análises em água e em camarão foram utilizadas como fases móveis, água ultrapura (A) e acetonitrila (B), ambas com 0,1% de ácido fórmico. O fluxo de injeção foi $400 \mu\text{L min}^{-1}$ e o volume de injeção foi programado para 10 μL . Para o modo de ionização positivo (ESI^+), o gradiente iniciou com 5% de B e aumentou linearmente até 95% aos 13 min, onde foi mantido constante por mais 3 minutos. O tempo de pós-corrída foi de 10 min em 5% de B. Para o modo de ionização negativo (ESI^-) o gradiente iniciou com 30% de B até 2 minutos e aumentou linearmente para 95% aos 5 min, e foi mantido constante por 2 min. O tempo de pós-corrída foi 11 min utilizando 30% de B. A temperatura da coluna foi mantida a 30°C . Na fonte de ionização a temperatura do gás foi ajustada para 350°C com fluxo de 10 L min^{-1} , a uma pressão de 50 psi no nebulizador e voltagem capilar de 4000 V.

Tabela 2 - Antibióticos, tempos de retenção (tR), íons precursores, íons produtos, energia de fragmentação e energia de colisão

| Antibióticos | tR(min) | | | Íon Precursor (m/z) | Íon Produto (m/z) | Energia de Fragmentação (V) | Energia de Colisão (eV) |
|------------------|-----------------|------------------|------------------|---------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|
| | AG ¹ | SED ² | CAM ³ | | | | |
| Tetraciclínas | | | | | | | |
| CTC | 10,22 | 8,9 | 10,37 | 479,1 | 462,2* | 125 | 12 |
| | | | | 479,1 | 444,1** | 125 | 17 |
| OTC | 9,62 | 8,54 | 9,84 | 461,2 | 426* | 115 | 16 |
| | | | | 461,2 | 201,1** | 115 | 41 |
| TC | 9,89 | 8,99 | 10,03 | 445,2 | 410,2* | 115 | 17 |
| | | | | 445,2 | 154,2** | 115 | 30 |
| Sulfonamidas | | | | | | | |
| SDM | 11,88 | 12,23 | 11,87 | 256 | 156* | 90 | 8 |
| | | | | 256 | 108** | 90 | 20 |
| SMZ | 9,88 | 9,85 | 10,11 | 311,1 | 156* | 120 | 16 |
| | | | | 311,1 | 108** | 120 | 28 |
| STZ | 10,88 | 9,01 | 9,1 | 279,1 | 186* | 115 | 12 |
| | | | | 279,1 | 156** | 115 | 16 |
| Fluoroquinolonas | | | | | | | |
| CFX | 9,81 | 8,65 | 9,95 | 332,1 | 288,1* | 125 | 13 |
| | | | | 332,1 | 245,1** | 125 | 22 |
| EFX | 10,05 | 9,15 | 10,21 | 360,2 | 342,2* | 132 | 17 |
| | | | | 360,2 | 316,2** | 132 | 16 |
| NFX | 9,72 | 8,51 | 9,91 | 320,1 | 302,1* | 125 | 20 |
| | | | | 320,1 | 231** | 125 | 44 |
| SAR | 10,35 | 10,16 | 10,5 | 386,1 | 342,1* | 119 | 15 |
| | | | | 386,1 | 299,1** | 119 | 26 |
| Anfenicóis | | | | | | | |
| CAP | 11,41 | 11,93 | 11,49 | 323 | 305* | 70 | 0 |
| | | | | 323 | 275** | 70 | 8 |
| FF*** | 2,98 | 11,57 | 3,06 | 355,9 | 335,9* | 139 | 5 |
| | | | | 355,9 | 185,1** | 139 | 13 |

*Transições utilizadas para quantificação;

** Transições utilizadas para qualificação;

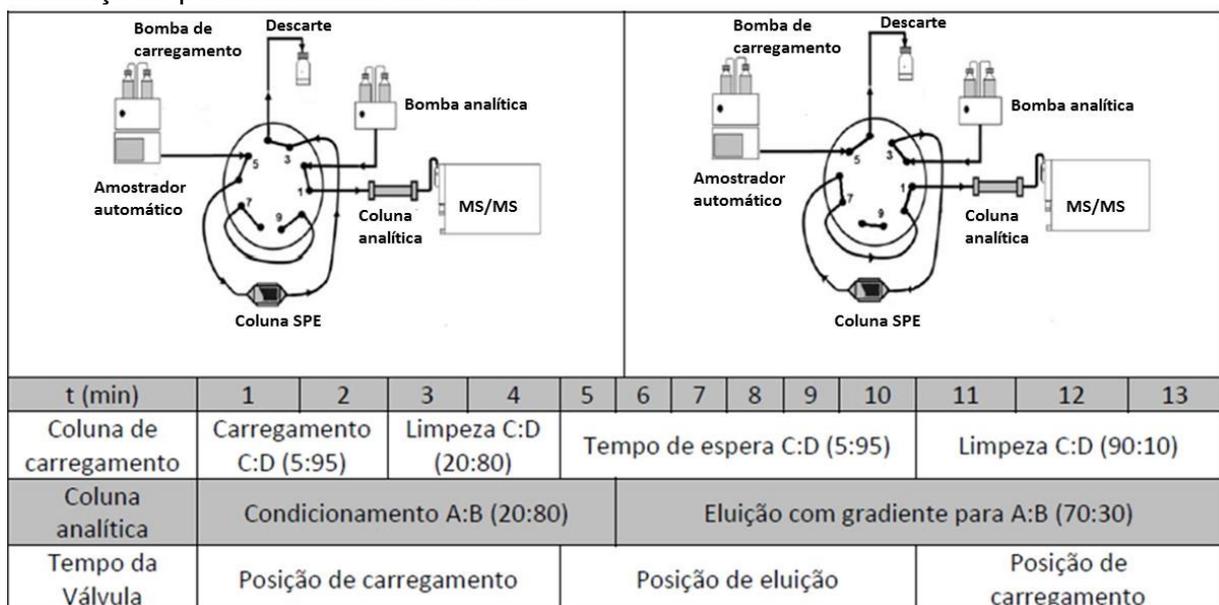
*** Ionização no modo negativo

¹Água; ²Sedimentos; ³Camarão

Para as análises em sedimentos foram utilizadas como fases móveis, metanol (C), água ultrapura pH 4, acidificada com ácido ortofosfórico (D), e acetonitrila (A) e água ultrapura (B), ambas com 0,1% de ácido fórmico. As condições cromatográficas foram as mesmas para os modos de ionização positivo (ESI⁺) e negativo (ESI⁻). A coluna do *on line* SPE-LC-MS/MS foi carregada com as fases

móveis C e D na proporção de 5:95 (v/v) por um período de 2 minutos. Um gradiente linear até 20:80 (v/v) de C e D até os 4 min, foi usado para limpar a amostra retida na coluna antes de se transferir os analitos para a coluna analítica. O fluxo de injeção foi de 1 mL min^{-1} e o volume de injeção foi programado para $900 \mu\text{L}$. Para o condicionamento da coluna analítica foi usado as fases móveis acetonitrila (A) e água ultrapura (B), ambas com 0,1% de ácido fórmico, na proporção 20:80 (v/v) em fluxo de injeção de $400 \mu\text{L min}^{-1}$. A proporção foi mantida por até 5 min, enquanto a válvula se posicionou para eluição aos 4 min e os analitos foram eluídos para coluna analítica. Após 5 min o gradiente na bomba analítica de A e B foi até 70:30 (v/v) em 8 min. Passados 10 min do início da corrida, a válvula retornou para posição de carregamento e a coluna semi-preparativa foi lavada durante 3 min com as fases móveis C e D na proporção 90:10 (v/v). Após 13 minutos e término da corrida as fases móveis C e D voltaram para as condições iniciais permanecendo por 15 min até um total reequilíbrio do sistema (Figura 4). A temperatura da coluna foi mantida a 30°C durante toda análise. Na fonte de ionização a temperatura do gás foi ajustada para 325°C com fluxo de 12 L min^{-1} , a uma pressão de 50 psi no nebulizador e a voltagem capilar de 4000 V.

Figura 4 - Sistema *on line* SPE-LC-MS/MS com direcionamento das fases móveis, tempo de eluição das fases móveis na coluna de carregamento e coluna analítica e tempo de mudança do posicionamento da válvula



Esquema do sistema: **Esquerda:** Válvula em posição de Carregamento; **Direita:** Válvula em posição de eluição. (A) acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico; (B) água ultrapura contendo 0,1% de ácido fórmico; (C) metanol; (D) água ultrapura pH 4 acidificada com ácido ortofosfórico.

Fonte: Adaptado de Monteiro et al. (2016).

4.7 Validação, quantificação e controle de qualidade dos métodos

Para validação dos métodos, foram avaliados os parâmetros de estabilidade de longa duração do analito na matriz, conforme proposto por Hillebrand et al. (2013), e os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão intradia (repetitividade ou análises em mesmo dia) e precisão interdia (precisão intermediária ou reprodutibilidade das análises em dias distintos), baseados no guia Eurachem (EURACHEM, 2014).

Para os ensaios de validação e controles de qualidade dos métodos de análises, foram consideradas amostras em branco, as que não apresentaram interferentes em mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse ou maiores que 30% do LQ. Todas as amostras em branco foram analisadas pelo mesmo procedimento de preparo e extração das amostras reais.

A seletividade foi avaliada em extratos de amostras em branco e extratos de amostras em branco fortificados, com os antibióticos em estudo, para avaliação de interferentes, na região cromatográfica de interesse.

Para os experimentos de linearidade, as curvas de calibração foram construídas por padronização externa em sete diferentes níveis de concentração em extratos das matrizes em branco. Cada nível foi analisado em triplicata ($n = 3$) e a confirmação da linearidade foi realizada mediante gráficos de resíduos, coeficiente de correlação (r^2) e teste *Goodness-of-fit*. Todos os cálculos foram realizados no software VaLChrom, da Universidade de Tartu, Estônia, disponível *on line* em: <https://mooc.valchrom.ut.ee/>.

As curvas de calibração que representaram os antibióticos foram construídas com os níveis de concentração 5; 7,5; 10; 12,5; 25; 50 e 100 ng mL⁻¹ para água; 10; 20; 30; 50; 100; 200 e 500 µg kg⁻¹ para sedimentos, e 5; 10; 30; 50; 100; 200 e 400 µg kg⁻¹ para camarões. Os primeiros níveis de concentração empregados na construção das curvas analíticas foram definidos após prévia checagem da menor quantidade detectável dos antibióticos na matriz em modo MRM.

Os limites de detecção (LD) e o de quantificação (LQ) de cada antibiótico foram calculados a partir do desvio padrão obtido dos resultados de 7 análises consecutivas do 1º. nível de concentração da curva de calibração. O valor de LD foi considerado 3 vezes, e o LQ 10 vezes, o desvio padrão calculado. Todos os cálculos

foram realizados no software ValChrom, da Universidade de Tartu, Estônia, disponível *on line* em: <https://mooc.valchrom.ut.ee/>.

O parâmetro de exatidão foi avaliado por ensaios de recuperação, expressos em porcentagem e foram determinados pela razão da concentração dos antibióticos encontrada na amostra em branco fortificado (antes da extração), pela concentração adicionada. Para água, sedimentos e camarões, a recuperação foi calculada, respectivamente, nos níveis 10; 30 e 60 ng mL⁻¹; 20; 50 e 200 µg kg⁻¹ e 30; 50 e 200 µg kg⁻¹, todos analisados em quintuplicata de injeções ($n = 5$). Foi adotado como critério de aceitação, recuperações médias variando de 70-120% em cada nível.

Os ensaios de recuperação para matriz água foram realizados com 100 mL de água deionizada em pH 7,9, fortificadas com alíquotas de 10; 30 e 60 µL de uma solução mix de antibióticos em concentração de 1 µg mL⁻¹ preparada em metanol.

Os parâmetros de precisão intradia e precisão interdia foram avaliados pelo coeficiente de variação (CV%) obtidos das análises realizadas nos ensaios de recuperação. Foi adotado como critério de aceitação, o coeficiente de variação (CV%) de até 20% em cada nível em que a recuperação atendeu os critérios de médias variando de 70-120%. Todos os níveis de concentração avaliados nos ensaios de recuperação de cada matriz foram a base para avaliação da precisão intradia. Para a avaliação da precisão interdia, ocorridas em intervalos variando de 2 a 8 dias pós-avaliação da precisão intradia, foram selecionados, os níveis 30 ng mL⁻¹ para água, 200 µg kg⁻¹ para sedimentos e 30 µg kg⁻¹ para camarão.

Os testes de estabilidade de longa duração foram realizados por ensaios de recuperação em cada matriz, a partir de amostras em branco, fortificadas em triplicata, ($n = 3$) em 2 níveis de concentração para 2 tempos de armazenamento (t_1 e t_2). Os níveis de concentração representaram pontos abaixo e acima do ponto médio das respectivas curvas analíticas, sendo 30 e 60 ng mL⁻¹ para água acondicionada em cartuchos SPE HLB Oasis (500 mg, 6 mL; Waters), e 50 e 300 µg kg⁻¹ para sedimentos e em músculo de camarão. Os tempos de armazenamento a -20 °C (t_1 e t_2) foram 60 e 90 dias para a matriz água, 35 e 90 dias para sedimento, e 43 e 105 dias para músculo de camarão. Os resultados das análises (t_1 e t_2) foram comparados com amostras em mesma concentração preparadas no dia (t_0), e foram determinados por novas curvas analíticas e controles de qualidade. O critério de aceitação adotado para considerar a estabilidade dos analitos nas matrizes, foi a variação de até $\pm 20\%$ nos resultados, considerando as

amostras (t_0) como 100%, conforme proposto por Hillebrand et al. (2013). Os resultados obtidos estão anexos.

A quantificação dos compostos nas amostras reais ocorreu se atendidos os critérios de manutenção de mesmo tempo de retenção que o padrão de calibração correspondente (dentro de $\pm 5\%$), e cromatogramas para cada transição de íons selecionados (íon produto de quantificação e íon produto de confirmação).

Durante todas as análises das bateladas de amostras reais, foram preparadas novas curvas de calibração nos extratos das matrizes e empregados como controle de qualidade, análises em brancos de amostra, brancos de solvente e brancos fortificados, com objetivo de verificar a manutenção do desempenho dos métodos e episódios de coeluição ou contaminação.

4.8 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) para verificar a interação e, quando foi significativa pelo teste de F , as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta das amostras

As coletas foram realizadas em horários de maré baixa, sem incidência de chuvas nos momentos e 24 h anteriores à atividade.

O estágio de engorda dos camarões em fase de despesca correspondeu, respectivamente, a 74, 39, 30, 75 e 90 dias, nas Fazendas de 1 a 5.

As amostras de água e sedimentos para o estudo da distribuição espacial dos antibióticos, a montante (lagoa ou canal de captação de água) e a jusante dos viveiros (lagoa de sedimentação ou canal de drenagem), foram coletadas nas Fazendas 1, 2, 3 e 4. Na Fazenda 5, os pontos a montante e jusante foram representados por única amostra de água e sedimentos, por não haver lagoas ou canais de captação e drenagem independentes na propriedade, como nas demais fazendas.

5.2 Caracterização das Fazendas

Dentre as cinco fazendas escolhidas, a Fazenda 1 apresenta sistema intensivo de produção com densidade de povoamento de 150 pós-larvas/m², possui seis viveiros de 0,4 hectares, cobertos com estufas agrícolas e com aeradores de palhetas. As Fazendas 2, 3 e 4 são semi-intensivas (12 pós-larvas/m²) e a Fazenda 5 apresenta sistema extensivo (5 pós-larvas/m²), e todas continham de 6 a 22 viveiros abertos, variando entre 2-5 hectares em extensão. Aeradores de palhetas também foram verificados na Fazenda 4. Lagoas de captação e de sedimentação estão presentes na Fazenda 1 e na Fazenda 2. Nas demais Fazendas, 3 e 4, há canais de captação e drenagem independentes. Apenas na Fazenda 5 a captação e drenagem ocorria num único canal.

Cidades, povoados ou vilarejos não foram observados apenas nas proximidades da Fazenda 1.

5.3 Preparo, extração e determinação dos antibióticos

As amostras de água, diferentemente do método de SPE *on line* proposto por Monteiro et al. (2016), foram preparadas e extraídas por SPE *off line* em cartuchos HLB Oasis (500 mg, 6 mL; Waters) com intuito de facilitar a logística de transporte das amostras, na longa distância envolvida entre o campo de coleta e o laboratório de Ecotoxicologia do CENA/USP, em Piracicaba/SP. As otimizações feitas para eluição e reconstituição do eluato, estão descritas no item 5.4. Todos os parâmetros do LC-MS/MS seguiram os padrões trabalhados por Monteiro et al. (2015), na determinação dos antibióticos em músculo de tilápias (*Oreochromus niloticus*). Apesar das vantagens proporcionadas pelo SPE *on line* não serem usufruídas na matriz água, o uso do SPE *off line*, em compensação, trouxe outros benefícios com os cartuchos HLB Oasis (500 mg, 6 mL; Waters), reconhecidos por atuarem em compostos polares e não polares, permitirem a extração de analitos ácidos, neutros e básicos, numa ampla faixa de pH (1 a 14), e não possuem no material sorvente, grupos de silanóis livres associados a ligações irreversíveis (SEIFRTOVÁ et al., 2009; WEI et al., 2014; KIM et al., 2018). A concentração e estocagem das amostras nos cartuchos, feitas previamente em campo, trouxe um alto fator de concentração ao método analítico, permitindo a detecção e quantificação dos antibióticos em níveis de traços, e proporcionou comodidades em preservação, armazenamento e transporte das amostras para o laboratório (JARDIM, 2010).

O emprego de cartuchos de SPE Strata SAX (500 mg, 6 mL; Phenomenex) nas amostras de sedimentos, isolaram por troca aniônica os interferentes orgânicos com carga negativa coextraídos (ZHAO et al., 2016; ZHOU-LJ et al., 2012). A injeção subsequente dos extratos no sistema SPE *on line*, com os dispositivos para concentração, *clean up* e eluição da amostra para a coluna analítica de maneira sequencial e automatizada, reduziu o tempo total de preparo e análise das amostras, eliminando etapas convencionais de evaporação e reconstituição dos eluatos (JARDIM, 2010; MONTEIRO et al., 2016; KIM et al., 2018).

O isolamento do extrato de camarões em cartuchos Captiva ND (Agilent) contribuíram com a química verde, simplificando o método de remoção de interferentes particulados, fosfolipídicos e proteicos, comumente removidos com emprego de solventes orgânicos, tais como o n-hexano (SAXENA et al., 2018). Para obtenção do músculo houve redução de até 51,5% do peso médio encontrado nos

camarões íntegros. As diferenças dos pesos, antes e após remoção da carapaça, cefalotórax, calda, patas e intestino, são mostrados na Tabela 3.

As adições de Na₂EDTA nas amostras de sedimentos e camarões objetivaram proteger as tetraciclinas e fluoroquinolonas da complexação com metais (SEIFRTOVÁ et al., 2009; KIM et al., 2018).

Tabela 3 – Média de pesos dos camarões íntegros e após remoção da carapaça, cefalotórax, calda, patas e intestino

| Local | Peso Bruto (g) | Peso do Músculo (g) |
|-----------|----------------|---------------------|
| Fazenda 1 | 17,92 ± 4,12 | 8,77 ± 2,10 |
| Fazenda 2 | 3,79 ± 1,68 | 1,68 ± 0,93 |
| Fazenda 3 | 8,58 ± 1,31 | 4,09 ± 0,68 |
| Fazenda 4 | 11,44 ± 2,43 | 5,73 ± 1,21 |
| Fazenda 5 | 16,25 ± 1,64 | 8,37 ± 0,79 |

Os valores são representados pela média ± desvio padrão (n = 10)

5.4 Otimização do SPE *off line* para análises de água

O teste preliminar de eluição seguiu a proposta de Li et al. (2012) e Gao et al. (2012b) em extração simultânea de fluoroquinolonas e sulfonamidas em amostras de água de rio e efluentes com cartuchos SPE HLB Oasis. Foram empregados metanol em 5% de NH₄OH, como eluente, e água deionizada para reconstituição do eluato. Os índices de recuperação obtidos em nível de 50 ng mL⁻¹, preparado com água deionizada em pH 7,90, com alcalinidade semelhante a média das amostras reais, variaram entre 70-120% para as classe das sulfonamidas e anfenicóis, e < 50% para as classe das tetraciclinas e fluoroquinolonas.

Outros testes foram conduzidos com metanol em 5% de NH₄OH, fixado como eluente. A padronização dos procedimentos que trouxeram melhora da recuperação das tetraciclinas e fluoroquinolonas, envolveu a lavagem dos cartuchos, antes da eluição, com água deionizada em pH 2,5 (HCl 0,01N), (TLILI et al., 2016), e o uso de solução de metanol e água deionizada (20:80, v/v) em 0,1% de ácido fórmico para

reconstituição do eluato (HONG et al., 2015). Nessas condições, as recuperações foram mantidas entre 70-120% para as classes das sulfonamidas e anfenicóis, e elevou-se a média, das tetraciclinas e fluoroquinolonas para 50% e 70%. A lavagem dos cartuchos com água deionizada em pH 2,5 favoreceu o desempenho analítico da OTC, TC, EFX e CAP, quando comparado com teste sem a lavagem dos cartuchos, nas mesmas condições de eluição dos analitos e reconstituição do eluato. Segundo Seifrtová et al. (2009), o HCl tem papel importante na redução de interferentes, principalmente íons divalentes, se presentes nos cartuchos. Outra hipótese da melhora proporcionada pela lavagem, são os efeitos positivos da acidificação, mesmo que ocorrida após carregamento das amostras, na contra-mão da recomendação de muitos autores que a executam, como pré-preparo, antes do carregamento dos cartuchos. A obtenção da forma ácida ou neutra dos compostos de interesse pela acidificação prévia das amostras, entre pH 2,5 a 4 ou 2 unidades abaixo do pKa, aumentam a retenção dentro do SPE com sorvente polimérico (SEIFRTOVÁ et al., 2009; ZHOU-JL et al., 2012 ; GROS et al., 2013; KIM et al., 2018). No pré-preparo para as tetraciclinas, o pH das amostras abaixo do pKa (3,3 - 9) aumentam a retenção nos cartuchos de SPE (YANG et al., 2005; GROS et al., 2013).

As condições de carregamento e eluição foram mantidas constantes em todos os testes, sempre feitos a vazão de 5 mL min⁻¹ e com volumes das etapas de eluição e lavagem, divididos em 2 carregamentos.

5.5 Validação dos métodos cromatográficos

Para os ensaios de validação e controles de qualidade dos métodos de análises em águas, sedimentos e camarão, foram adotados, respectivamente, como amostras em branco, água deionizada, padronizada em laboratório em pH 7,90, com soluções de HCl (0,01 N) e NaOH (0,1 N), sedimentos coletados da lagoa de captação da Fazenda 1, e camarões, coletados da Fazenda 5, os quais não apresentaram interferentes em mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse ou maiores que 30% do LQ.

5.5.1 Seletividade

A seletividade foi assegurada pela apresentação de íons precursor e íons produtos, distintos uns dos outros, nos antibióticos estudados. Além disso, não foram identificados nos extratos de amostras em branco e extratos de amostras em branco fortificados, interferentes em mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse ou maiores que 30% do LQ. Os cromatogramas de íons totais (TIC) dos antibióticos com as transições selecionadas para as análises, são apresentados nas Figuras 5, 6 e 7.

Figura 5 – Cromatogramas dos extratos de amostra em branco e de amostra em branco fortificado (60 ng mL⁻¹), matriz água. (A) Modo positivo. (B) Modo negativo

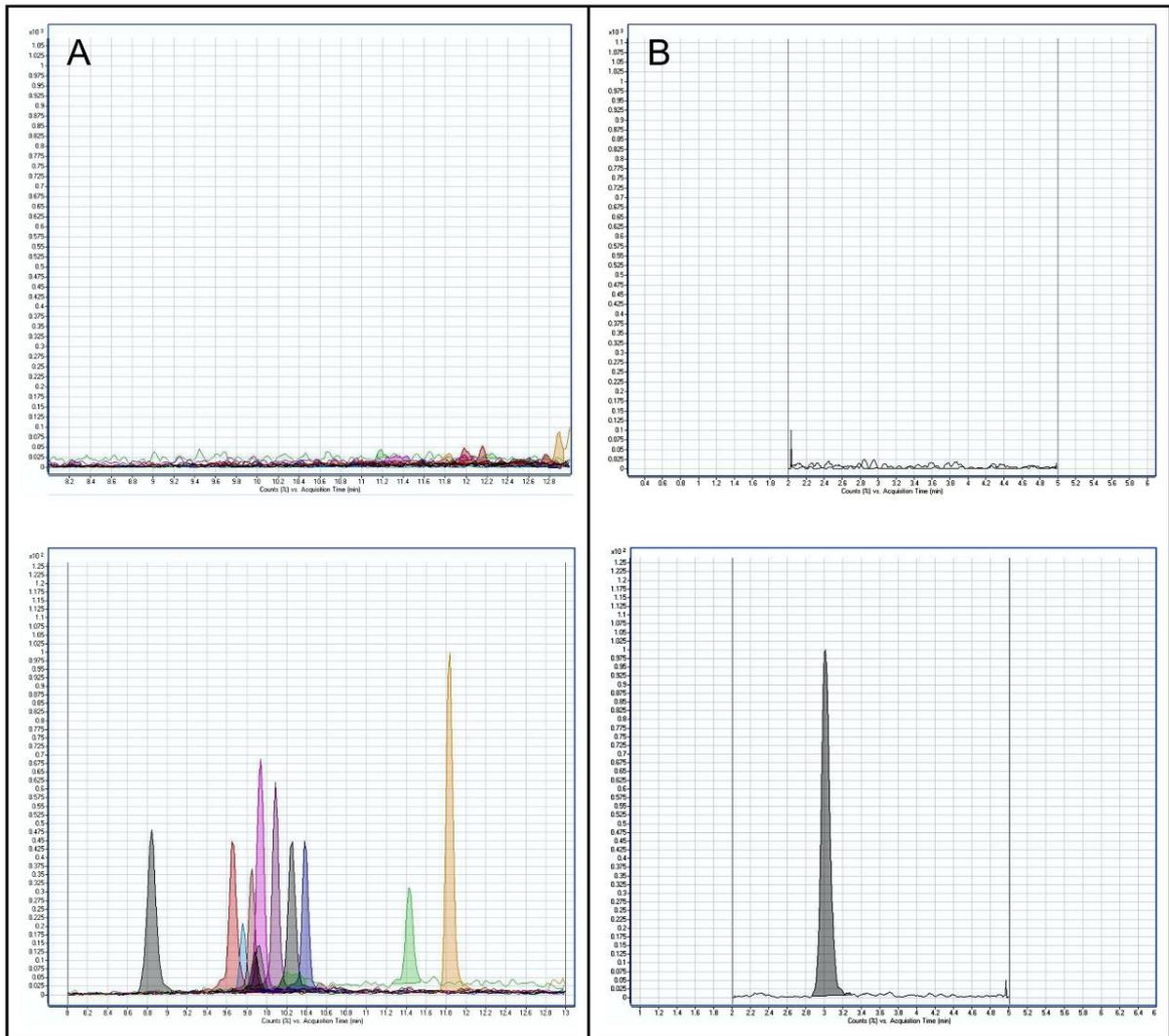


Figura 6 – Cromatogramas dos extratos de amostra em branco e de amostra em branco fortificado (200 $\mu\text{g kg}^{-1}$), matriz sedimentos. (A) Modo positivo. (B) Modo negativo

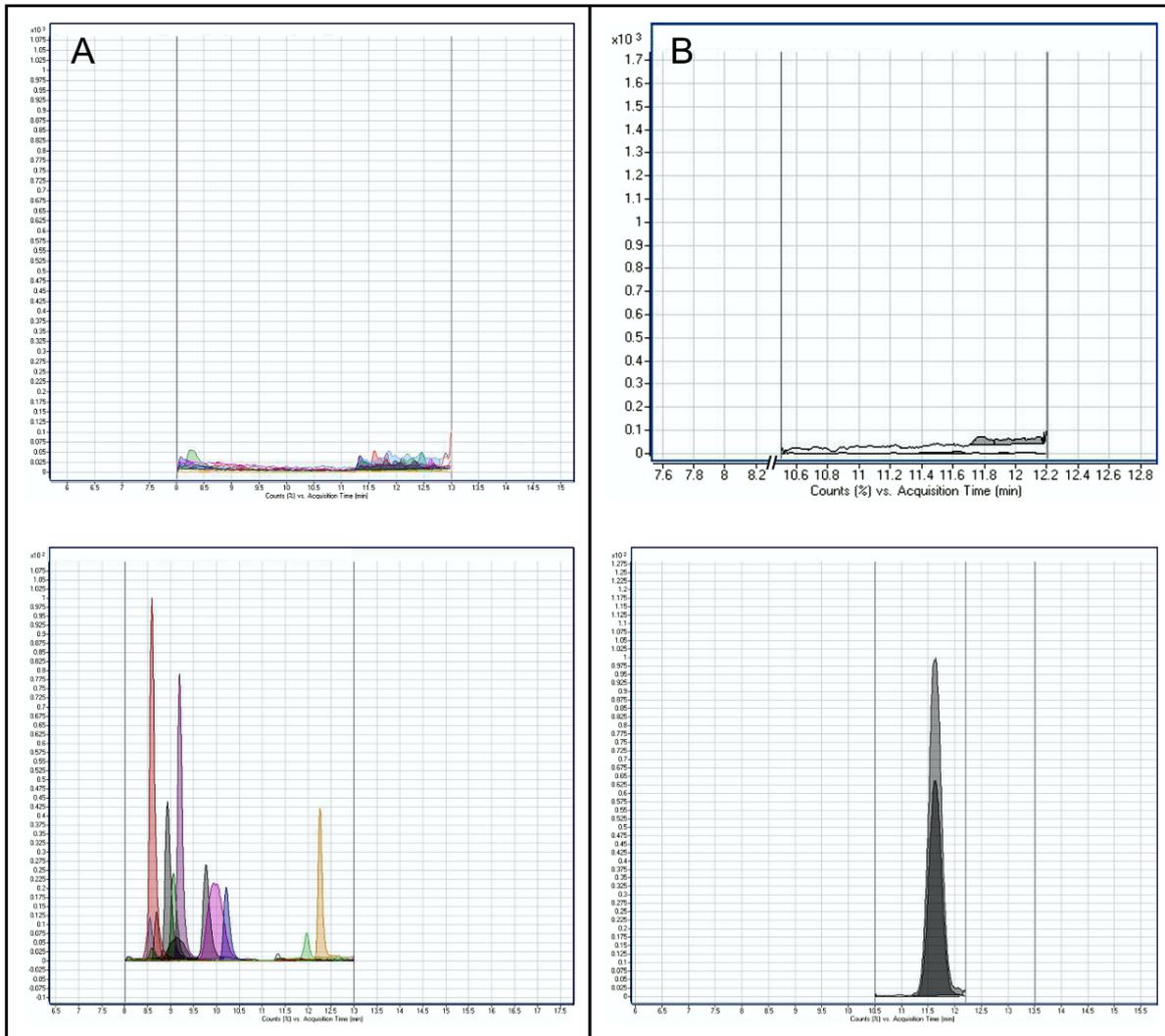
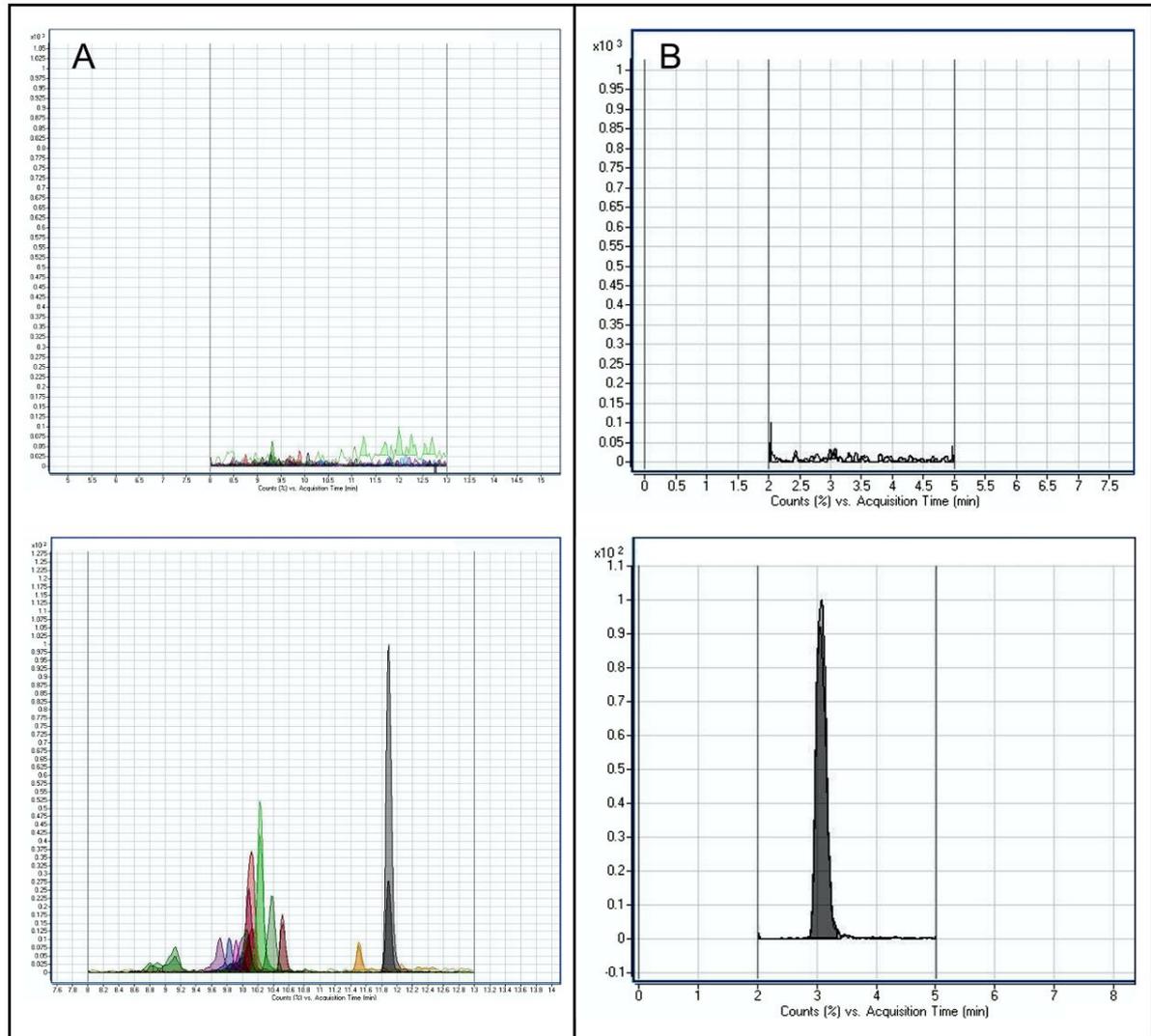


Figura 7 – Cromatogramas dos extratos de amostra em branco e de amostra em branco fortificado (200 $\mu\text{g kg}^{-1}$), matriz camarão. (A) Modo positivo. (B) Modo negativo



5.5.2 Linearidade

Os métodos mostraram linearidade no modo MRM nas diferentes concentrações estudadas para cada antibiótico, apresentando coeficiente de correlação (r^2) bem ajustado pela curva, $\geq 0,98$, valores de F experimental para o teste *Goodness-of-fit*, superiores ao F tabelado (8,0959) em nível de 1% de significância, e gráficos dos resíduos com variância constante (homocedastidade), com resíduos normalmente distribuídos e com ausência de amostras atípicas. As precisões dos níveis de concentração presentes nas curvas apresentaram variação

menor que 20%. As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam as equações da reta, coeficientes de correlação e resultados do teste F (*Goodness-of-fit*) para os antibióticos estudados nas matrizes, água, sedimentos e camarão.

Tabela 4 – Equações da reta, coeficientes de correlação (r^2) e resultados do teste F (*Goodness-of-fit*) para os antibióticos estudados em água

| Antibióticos | Equação da reta | r^2 | $F(\text{goodness-of-fit})$ |
|---------------------|----------------------------------|-------------------------|---|
| Tetraciclinas | | | |
| CTC | $y = 1340,184846x - 3474,609683$ | 0.9990 | 6710,23853 |
| OTC | $y = 2454,763373x - 6911,201183$ | 0.9975 | 2555,518065 |
| TC | $y = 2024,933235x + 9928,29375$ | 0.9986 | 4642,577588 |
| Sulfonamidas | | | |
| SDM | $y = 5878,678406x - 1044,292538$ | 0.9992 | 8189,989459 |
| SMZ | $y = 3585,711533x - 7542,150211$ | 0.9984 | 4197,712067 |
| STZ | $y = 1564,885054x - 3406,382142$ | 0.9990 | 6650,548791 |
| Fluoroquinolonas | | | |
| CFX | $y = 1194,071207x - 2723,419383$ | 0.9972 | 2296,718792 |
| EFX | $y = 981,260754x - 2180,2115$ | 0.9938 | 1026,967168 |
| NFX | $y = 829,578105x - 2402,123923$ | 0.9929 | 897,998168 |
| SAR | $y = 1306,379577x - 3460,325866$ | 0.9958 | 1512,117025 |
| Anfenicóis | | | |
| CAP | $y = 384,310195x - 599,619723$ | 0.9972 | 2314,95499 |
| FF | $y = 32,414339x + 21,502104$ | 0.9937 | 1007,426611 |

Tabela 5 – Equações da reta, coeficientes de correlação (r^2) e resultados do teste F (*Goodness-of-fit*) para os antibióticos estudados em sedimentos

| Antibióticos | Equação da reta | r^2 | $F(\text{goodness-of-fit})$ |
|------------------|-------------------------------------|--------|-----------------------------|
| Tetraciclínas | | | |
| CTC | $y = 20435,632271x - 185535,884418$ | 0,9985 | 4440,454751 |
| OTC | $y = 20866,07968x - 353344,347136$ | 0,9978 | 2888,337796 |
| TC | $y = 14854,36942x - 254889,960162$ | 0,9981 | 3313,958116 |
| Sulfonamidas | | | |
| SDM | $y = 55497,490646x - 292514,577645$ | 0,9998 | 36700,56686 |
| SMZ | $y = 28310,945363x - 53276,488356$ | 0,9995 | 13048,79403 |
| STZ | $y = 7817,476296x - 66930,721461$ | 0,9975 | 2574,899604 |
| Fluoroquinolonas | | | |
| CFX | $y = 7862,483052x - 78226,44037$ | 0,9992 | 8406,929273 |
| EFX | $y = 35852,113775x - 235205,845963$ | 0,9996 | 20369,84019 |
| NFX | $y = 16151,421894x - 20260,109756$ | 0,9977 | 2824,567748 |
| SAR | $y = 8765,484702x - 118836,260102$ | 0,9986 | 4778,447238 |
| Anfenicóis | | | |
| CAP | $y = 2227,638854x - 5515,571779$ | 0,9992 | 8679,021999 |
| FF | $y = 1179,488269x - 24273,229082$ | 0,9887 | 719,432602 |

Tabela 6 – Equações da reta, coeficientes de correlação (r^2) e resultados do teste F (*Goodness-of-fit*) para os antibióticos estudados em camarão

| Antibióticos | Equação da reta | r^2 | $F(\text{goodness-of-fit})$ |
|------------------|-----------------------------------|--------|-----------------------------|
| Tetraciclínas | | | |
| CTC | $y = 555,763702x - 10195,340832$ | 0,9892 | 580,870223 |
| OTC | $y = 237,144219x - 4890,002071$ | 0,9881 | 458,135215 |
| TC | $y = 447,062418x - 8952,559835$ | 0,9863 | 3313,958116 |
| Sulfonamidas | | | |
| SDM | $y = 964,930567x - 12602,618698$ | 0,9963 | 1748,632863 |
| SMZ | $y = 584,315474x - 7691,055566$ | 0,9953 | 1358,687961 |
| STZ | $y = 161,139178x - 1270,395599$ | 0,9896 | 604,031521 |
| Fluoroquinolonas | | | |
| CFX | $y = 106,852979x - 1089,392997$ | 0,9916 | 750,590563 |
| EFX | $y = 1009,182128x - 16772,494833$ | 0,9925 | 844,795739 |
| NFX | $y = 239,193734x - 3205,510474$ | 0,993 | 841,603688 |
| SAR | $y = 145,230509x - 2036,177949$ | 0,9937 | 973,311183 |
| Anfenicóis | | | |
| CAP | $y = 77,512847x - 868,282621$ | 0,9951 | 1312,008187 |
| FF | $y = 146,265488x - 1115,081882$ | 0,9985 | 4510,035852 |

5.5.3 Limites de detecção e quantificação, recuperação e precisão

Os limites de detecção (LD) e o de quantificação (LQ) obtidos para cada antibiótico e para cada matriz, bem como os resultados dos estudos de recuperação e precisão estão expressos na Tabela 7 para matriz água, Tabela 8 para sedimentos e Tabela 9 para camarão.

A aplicação do SPE *off line* nos testes de recuperação para o método de análise de água, apresentou fator de concentração de 100 vezes, considerando o volume de amostra em branco fortificada (100 mL) e reconstituição para *vial* de injeção (1 mL) no LC-MS/MS. Para as amostras reais, o fator de concentração foi de 1000 vezes, considerando os volumes de coleta (1 L) e de reconstituição para *vial* de injeção (1 mL).

Os resultados de LQ encontrados para camarão variaram de 1,24 (EFX) a 12,05 (STZ) $\mu\text{g kg}^{-1}$ e foram inferiores aos LMRs do Codex *Alimentarius* (CODEX, 2015) e do PNCRC/Animal-MAPA, (BRASIL, 2017), com exceção do CAP, antibiótico proibido no Brasil e União Européia, com limite para desempenho de métodos analíticos bastante restritivo, fixado em 0,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para laboratórios oficiais participantes de programas de monitoramento. No método de Monteiro et al. (2015), utilizado como referência e adaptado para o estudo, os resultados de LQ estiveram entre 0,9 (SDM) a 4,3 (NFX) $\mu\text{g kg}^{-1}$ e foram calculados pela relação sinal/ruído, 3:1 para o LD e 10:1 para o LQ.

Em todos os níveis de recuperação estudados em água, os antibióticos CTC, SDM, SMZ, CAP e FF tiveram índices satisfatórios na faixa de 70-120% e com CV (%) < 20%. Desempenhos satisfatórios pontuais, foram verificados em STZ em nível de 10 e 60 ng mL^{-1} , e para EFX e NFX, em nível de 60 ng mL^{-1} . Os compostos mais problemáticos, mesmo em baixos níveis de recuperação, indicaram CV (%) dentro do critério aceitável (Tabela 7).

Em sedimentos, todos os níveis de recuperação estudados nos antibióticos da classe das sulfonamidas, fluoroquinolonas, anfenicóis e da CTC, representando a classe das tetraciclina, tiveram índices satisfatórios na faixa de 70-120% e com CV (%) < 9%. Em TC foi verificado desempenho satisfatório em nível de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e com CV (%) variando entre 0,41 e 2%. O composto OTC teve desempenho insatisfatório em todos os níveis checados, porém com CV (%) dentro do critério aceitável (Tabela 8).

Tabela 7 – Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), recuperação e precisão dos antibióticos para amostras de água

| Antibióticos | LD ng mL ⁻¹ | LQ ng mL ⁻¹ | Recuperação (%) | | | | | | | |
|------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------|---------------------------|-----------|---------------------------|-----------|---------------------------|-----------|
| | | | Intradia | | | | | | Interdia | |
| | | | 10 ng mL ⁻¹ | CV (%) | 30 ng mL ⁻¹ | CV (%) | 60 ng mL ⁻¹ | CV (%) | 30 ng mL ⁻¹ | CV (%) |
| Tetraciclinas | | | | | | | | | | |
| CTC | 1,01 | 3,37 | 70,65 | 6,66 | 87,76 | 3,61 | 100,55 | 7,15 | 104,79 | 3,85 |
| OTC | 0,35 | 1,17 | 59,66 | 4,34 | 52,98 | 3,2 | 53 | 4,16 | 52,6 | 2,43 |
| TC | 0,71 | 2,37 | 15,37 | 7,99 | 58,13 | 1,91 | 49,38 | 4,1 | 52,5 | 2,42 |
| Sulfonamidas | | | | | | | | | | |
| SDM | 0,24 | 0,82 | 96,9 | 4,03 | 74,46 | 0,69 | 76,96 | 1,04 | 74,97 | 0,86 |
| SMZ | 0,45 | 1,5 | 94,17 | 4,95 | 94,64 | 0,76 | 75,03 | 1,76 | 70,26 | 1,33 |
| STZ | 0,36 | 1,22 | 98,83 | 6,29 | 61,38 | 1,94 | 70 | 1,97 | 65,03 | 1,72 |
| Fluoroquinolonas | | | | | | | | | | |
| CFX | 0,54 | 1,8 | 56,14 | 6,05 | 46,68 | 3,27 | 67,42 | 4,96 | 46,64 | 3,23 |
| EFX | 1,1 | 3,66 | 57,94 | 6,21 | 61,36 | 3,44 | 112,28 | 1,01 | 63,06 | 3,39 |
| NFX | 1,12 | 3,75 | 62,33 | 5,27 | 46,68 | 2,85 | 72,16 | 5,9 | 49,48 | 1,68 |
| SAR | 0,63 | 2,11 | 67,36 | 5,81 | 53,66 | 1,72 | 67,8 | 6,31 | 53,87 | 3,25 |
| Anfenicóis | | | | | | | | | | |
| CAP | 2,29 | 7,63 | 115,08 | 15,5 | 87,98 | 7,62 | 90 | 4,84 | 93,35 | 1,98 |
| FF | 1,93 | 6,44 | 101,6 | 10,2 | 92,15 | 6,97 | 76,87 | 17,7 | 118,32 | 3,52 |

Em todos os níveis de recuperação estudados em camarão, os antibióticos SDM, SMZ, STZ, CFX, EFX, NFX, CAP e FF, tiveram índices satisfatórios na faixa de 70-120% e com CV (%) variando de 0,66 a 11,5%. As recuperações de todas as tetraciclinas foram satisfatórias em nível de 30 µg kg⁻¹ com CV (%) entre 3,69 a 5,75%. Variações foram observadas com aumento da concentração em CTC e OTC, perdendo a eficiência de recuperação em 200 µg kg⁻¹. Ainda na classe das tetraciclinas e fluoroquinolonas, os antibióticos TC e SAR, ultrapassaram o critério de aceitação na concentração de 50 µg kg⁻¹. Os antibióticos, mesmo com desempenhos insatisfatórios, apresentaram CV (%) entre 1,08 a 11,1%, dentro do critério de aceitação imposto ao método (Tabela 9). Segundo Fernandez-Torres et al. (2011) e Zhao et al. (2018), a combinação de acetonitrila e água como solventes extratores equilibra e diversifica a extração de um maior número de analitos alvo, mas pode dificultar a precipitação de compostos indesejáveis e causadores de efeito matriz, como as proteínas solúveis em água.

Tabela 8 – Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), recuperação e precisão dos antibióticos para amostras de sedimentos

| Antibióticos | LD $\mu\text{g kg}^{-1}$ | LQ $\mu\text{g kg}^{-1}$ | Recuperação (%) | | | | | | | |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|------------------------------|-----------|------------------------------|-----------|
| | | | Intradia | | | | Interdia | | | |
| | | | 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | CV (%) | 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | CV (%) | 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | CV (%) | 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | CV (%) |
| Tetraciclina | | | | | | | | | | |
| CTC | 1,17 | 3,92 | 106,09 | 1,61 | 99,56 | 3,55 | 108,9 | 3,49 | 75,71 | 1,34 |
| OTC | 1,07 | 3,57 | 125,11 | 1,26 | 154,88 | 3,12 | 154,38 | 7,7 | 148,17 | 0,39 |
| TC | 0,37 | 1,23 | 119,36 | 2 | 141,31 | 3,79 | 146,39 | 12,6 | 107,99 | 0,41 |
| Sulfonamidas | | | | | | | | | | |
| SDM | 0,46 | 1,53 | 104,3 | 5,18 | 79,57 | 2,57 | 81,54 | 6,98 | 81,59 | 1,04 |
| SMZ | 0,55 | 1,82 | 97,21 | 2,86 | 70,59 | 3,47 | 70,34 | 2,74 | 83,64 | 0,87 |
| STZ | 1,3 | 4,35 | 113,02 | 8,19 | 97,8 | 0,72 | 83,36 | 0,84 | 71,27 | 1,2 |
| Fluoroquinolonas | | | | | | | | | | |
| CFX | 1,17 | 3,9 | 93,4 | 6,56 | 89,49 | 1,59 | 108,41 | 4,55 | 72,27 | 0,42 |
| EFX | 0,37 | 1,25 | 99,86 | 1,91 | 74,45 | 4,5 | 93,18 | 8,58 | 98,27 | 0,61 |
| NFX | 0,64 | 2,15 | 110,41 | 2,31 | 99,98 | 2,29 | 110,55 | 6,9 | 82,26 | 0,41 |
| SAR | 1,32 | 4,41 | 80,76 | 2,4 | 93,87 | 2,35 | 103,4 | 8,75 | 79,55 | 0,45 |
| Anfenicóis | | | | | | | | | | |
| CAP | 4,8 | 15,99 | 103,31 | 3,27 | 92,39 | 3,26 | 92,76 | 0,68 | 81,86 | 1,22 |
| FF | 0,8 | 2,67 | 109,83 | 1,76 | 99,32 | 1,35 | 70,7 | 1,7 | 85,64 | 3,79 |

De modo geral, os resultados de recuperações ineficientes observados para classe das tetraciclina e fluoroquinolonas nas 3 matrizes, podem estar relacionados também a íons metálicos quelados, que eluem com tempo de retenção muito próximos, indicando presença de certos componentes da matriz no extrato e explica variações de efeito matriz entre injeções (LI; KIJAK, 2011). Para contornar o efeito matriz em certa extensão em métodos multiclasse e multiresíduos, o uso de padrão interno, construção de curva matrizada, redução da vazão, diluição da amostra, melhoramento da resolução cromatográfica ou limpeza dos extratos antes da análise, são práticas recomendadas, porém ainda sujeitas as dificuldades impostas por uma ampla diversidade de particularidades em propriedades físico-químicas dos analitos (LI; KIJAK, 2011; ZHOU-JL et al., 2012; FEDOROVA et al., 2014). O uso de padrões internos, especialmente padrões isotópicos, tem alto custo e nem sempre estão disponíveis para o uso proposto. Além disso, em métodos para determinação de multiclasse e multiresíduos, mais de um padrão interno pode ser necessário, porém em todos os casos, podem facilitar e corrigir as variações (DÍAZ-CRUZ;

BARCELÓ, 2005; FEDOROVA et al., 2014). Em SPE, a presença de componentes da matriz ou de outros analitos em altas concentrações pode levar à adsorção competitiva ou dessorção seletiva, levando a possíveis erros no processo de partição (RIDGWAY et al., 2007; PRESTES et al., 2013).

Tabela 9 – Limite de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), recuperação e precisão dos antibióticos para amostras de camarão

| Antibióticos | LD $\mu\text{g kg}^{-1}$ | LQ $\mu\text{g kg}^{-1}$ | Recuperação (%) | | | | | | | |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|------------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|
| | | | Intradia | | | | Interdia | | | |
| | | | 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | CV (%) | 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | CV (%) | 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | CV (%) | 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | CV (%) |
| Tetraciclina | | | | | | | | | | |
| CTC | 1,73 | 5,77 | 101,55 | 3,69 | 82,6 | 2,32 | 66,3 | 1,08 | 85,71 | 5,06 |
| OTC | 1,47 | 4,91 | 110,03 | 5,75 | 88,29 | 4,31 | 63,43 | 11,1 | 79,97 | 4,82 |
| TC | 1,05 | 3,5 | 115,12 | 4,22 | 124,42 | 9,75 | 74,15 | 3,44 | 86,54 | 6,66 |
| Sulfonamidas | | | | | | | | | | |
| SDM | 0,63 | 2,08 | 119,75 | 2,03 | 117,01 | 1,52 | 108,63 | 1,94 | 120 | 1,27 |
| SMZ | 0,78 | 2,59 | 112,61 | 3,53 | 108,42 | 1,98 | 101,44 | 2,43 | 115,89 | 3,06 |
| STZ | 3,61 | 12,05 | 107,51 | 1,55 | 101,68 | 5,4 | 105,4 | 10,9 | 101,27 | 13 |
| Fluoroquinolonas | | | | | | | | | | |
| CFX | 1,5 | 5,01 | 92,21 | 4,73 | 77,53 | 5,63 | 98,12 | 2,33 | 95,77 | 9,15 |
| EFX | 0,37 | 1,24 | 100,7 | 5,85 | 84,25 | 1,11 | 79,85 | 4,39 | 92,19 | 1,75 |
| NFX | 2,22 | 7,42 | 86,15 | 1,78 | 71,44 | 8,3 | 82,65 | 3,56 | 90,28 | 3,44 |
| SAR | 1,96 | 6,55 | 116,07 | 6,96 | 121,35 | 6,16 | 100,51 | 1,45 | 111,55 | 3,33 |
| Anfenicóis | | | | | | | | | | |
| CAP | 1,36 | 4,55 | 117,63 | 11,5 | 119,51 | 8,67 | 111,37 | 5,25 | 116,54 | 8,94 |
| FF | 0,65 | 2,16 | 114,89 | 0,66 | 118,66 | 2,11 | 102,95 | 0,85 | 114,3 | 2,18 |

5.5.4 Estabilidade de longa duração

Os antibióticos exibiram diferentes estabilidades em função da classe química, concentração, tipo de matriz e tempo de armazenamento. Em número de ocorrência, em músculo de camarão, a exibição de estabilidade foi superior, comparada a água e sedimentos (Anexos A, B e C). No total, 8 antibióticos em músculo de camarão, mantiveram-se estáveis na menor concentração ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$) nos tempos de armazenamento t1 e t2 (CTC, TC, SDM, SMZ, STZ, EFX, CAP e FF). Com exceção de STZ (t1) e CTC (t1 e t2), o mesmo grupo, conferiu estabilidade na

maior concentração ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$) nos dois tempos. No estudo de estabilidade de antibióticos realizado por Rezk et al. (2015), o armazenamento durante 2 semanas de tecido muscular de tilápias (*Oreochromus niloticus*) a -20°C manteve a estabilidade para os antibióticos CFX, SDM e FF nas 3 concentrações avaliadas ($1,5$ (SDM) a 90 (CFX) ng g^{-1}). Vardali et al. (2018), encontraram estabilidade para CTC e TC em amostras de músculo de robalo europeu, fortificadas em $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ após 11 dias de armazenamento a -30°C . O critério adotado considerou aceitável, degradação inferior a 11% em relação a t_0 . Observaram ainda, estabilidade para OTC, CFX, EFX e NFX após 17 dias de armazenamento na concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e após 20 dias para SAR na concentração de $30 \mu\text{g kg}^{-1}$.

A água acondicionada em cartuchos SPE, apresentou em t_1 , 7 antibióticos estáveis, na menor concentração (30ng mL^{-1}), dos quais fizeram parte CTC, TC, SDM, SMZ, STZ, EFX e SAR. No mesmo tempo, a estabilidade foi observada apenas para TC e SAR na maior concentração (60ng mL^{-1}). Em t_2 , apenas na maior concentração (60ng mL^{-1}) foram observadas estabilidade para SDM, SMZ, STZ, NFX e FF. No estudo de Llorca et al. (2014), água deionizada fortificada em 10ng mL^{-1} e acondicionada em cartuchos SPE Oasis HLB (60 mg, 3 ml; Waters) apresentaram estabilidade para SDM e EFX após 1 semana de armazenamento a -20°C e até 12 semanas para STZ. No mesmo estudo, não obtiveram estabilidade para CTC, OTC, TC, CFX e NFX nos 3 períodos de armazenamento avaliados (1, 2 e 12 semanas). A estabilidade de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de SDM e SMZ em água Milli-Q[®] acondicionada em cartuchos SPE Oasis HLB (60 mg, 3 ml; Waters) também foi confirmada por Carlson et al. (2013) após 576 dias de armazenamento a -20°C . As perdas foram até 18%, comparado aos resultados em t_0 .

Em sedimentos, o número de antibióticos estáveis foi mais visível na maior concentração ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$) e no tempo t_1 de armazenamento (CTC, TC, CFX, NFX, SAR, CAP). Os antibióticos, TC e CAP (t_1) e CTC e FF (t_2), apresentaram estabilidade nas concentrações de 50 e $300 \mu\text{g kg}^{-1}$. Há carência de estudos recentes com enfoque analítico na estabilidade de longa duração de antibióticos em sedimentos e solos armazenados. Samuelsen et al. (1994), observaram estabilidade para OTC e SDM em sedimentos marinhos, fortificados com $50 \mu\text{g g}^{-1}$ e mantidos a -20°C durante 180 dias.

Segundo Llorca et al. (2014) e Carlson et al. (2013), problemas na estabilidade podem ser contornados pela adição de padrões internos nas amostras, após coleta e antes das análises, um recurso que monitora as perdas no armazenamento e normaliza os resultados finais. No entanto, os autores reconhecem, sob o ponto de vista prático, as inviabilidades comerciais e financeiras para implementação dessa abordagem.

5.6 Parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos de qualidade da água foram avaliados em cada ponto de coleta e os resultados estão apresentados na Tabela 10. Os valores encontrados foram também comparados com os valores especificados pela Resolução Nº 357 de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) para águas salinas Classe I, destinadas à aquicultura e atividade de pesca (BRASIL, 2005).

A checagem dos parâmetros de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade, são rotina diária nos viveiros de engorda e auxiliam o produtor na tomada de decisões e ações corretivas necessárias à manutenção das condições ideais de cultivo, incluindo renovação da água, fertilização e calagem (ABCCAM, 2017b).

As medições de temperatura nos viveiros de engorda apresentaram valores dentro da faixa ideal recomendada de 26 a 33 °C para superfície (ABCCAM, 2017b), mesmo sendo observado um pequeno desvio, intrínseco às medições (erro sistemático e erro aleatório), de 0,2°C acima da faixa ideal no viveiro da Fazenda 5. Nos demais pontos de coleta a temperatura variou de 30,3 a 33,4 °C a montante e de 30,2 a 33,4 °C a jusante. A temperatura da água tem papel fundamental para o metabolismo dos crustáceos, crescimento e sobrevivência, consumo de oxigênio, ciclo de muda e resposta imunológica (FERREIRA; BONETT; SEIFFERT, 2011) (Tabela 10).

Com exceção do pH de 9,29 observado no viveiro da Fazenda 1, os demais viveiros apresentaram valores entre 7,10 a 8,59 e estiveram dentro da faixa de 7 a 9 recomendada para criação de camarões (ABCCAM, 2017b). Os valores a montante e a jusante dos viveiros ficaram na faixa de 7,51 a 8,58 e 7,36 a 8,55, respectivamente. De acordo com o padrão de pH para águas salinas Classe I, recomendável pelo CONAMA 357, ficaram fora de 6,5 a 8,5, os pontos da

Fazenda 1, de viveiro e a montante, e viveiro e montante/jusante da Fazenda 5, porém com desvios de baixa significância, intrínsecos às medições (erro sistemático e erro aleatório), (Tabela 10).

Tabela 10 – Características físico-químicas das amostras de água nos diferentes pontos de coleta em cada fazenda de cultivo de camarão

| Fazenda | T °C | pH | ORP (REDOX) | OD (mg L ⁻¹) | CE (µS cm ⁻¹ @ 25°C) | STD (mg L ⁻¹) | Turb (NTU) | SAL (ppt) |
|---------|------|------|----------------|-----------------------------|---------------------------------------|------------------------------|---------------|--------------|
| 1-V | 30,0 | 9,29 | +0253,0 | 7,12 | 70657 | 45927 | 82,80 | 35,32 |
| 1-M | 30,3 | 8,58 | +0387,4 | 8,31 | 59774 | 38853 | 12,50 | 29,88 |
| 1-J | 30,2 | 7,48 | +0448,4 | 6,55 | 73463 | 47750 | 50,50 | 36,73 |
| 2-V | 32,0 | 7,99 | +0177,8 | 8,38 | 78385 | 50949 | 5,1 | 39,18 |
| 2-M | 31,2 | 7,51 | +0141,9 | 8,14 | 57414 | 37319 | 14,60 | 39,69 |
| 2-J | 31,5 | 7,36 | +0128,5 | 7,87 | 52800 | 34320 | 8,80 | 26,40 |
| 3-V | 32,1 | 8,03 | +0175,6 | 8,50 | 76969 | 50029 | 5,40 | 38,48 |
| 3-M | 33,4 | 8,14 | +0151,5 | - | 50198 | 32628 | 3,90 | - |
| 3-J | 33,4 | 8,02 | +0139,6 | 3,42 | 50198 | 32628 | 21,60 | 25,09 |
| 4-V | 31,3 | 7,10 | +0126,6 | 6,92 | 83946 | 54564 | 36,20 | 41,97 |
| 4-M | 31,4 | 7,88 | +0139,0 | 6,85 | 54589 | 35482 | 27,00 | 27,29 |
| 4-J | 32,9 | 7,85 | +0106,8 | 6,87 | 37455 | 24345 | 64,90 | 18,72 |
| 5-V | 33,2 | 8,59 | +0140,0 | 8,98 | 72428 | 47078 | 41,70 | 36,21 |
| 5-M/J | 33,0 | 8,55 | +0118,3 | 6,81 | 63497 | 41273 | 38,10 | 31,74 |

*V=Viveiro; M=montante dos viveiros; J=jusante dos viveiros; ORP=potencial de oxi-redução; OD=oxigênio dissolvido; CE=condutividade elétrica; STD=sólidos totais dissolvidos; Turb=Turbidez; SAL=salinidade;

O potencial de oxi-redução (ORP) mede a capacidade de uma substância ganhar ou perder elétrons. Valores positivos indicam que o ambiente está oxidado, portanto, é um parâmetro ligado ao parâmetro de oxigênio dissolvido (OD) (USEPA, 2017a). Os valores encontrados nos viveiros e nos pontos a montante e a jusante, variaram respectivamente, de +0126.6 a +0253.0, de +0118.3 a +0387.4 e +0106.8 a +0448.4 (Tabela 10).

O oxigênio dissolvido (OD) é a quantidade de oxigênio presente na água por meio da atmosfera e de plantas aquáticas. É um indicador direto da capacidade de um recurso aquático de apoiar a vida aquática. O oxigênio dissolve-se mais em águas correntes ou sob baixas temperaturas. A decomposição de materiais orgânicos promove um consumo de OD pelos microrganismos aeróbios e a medida que os níveis de OD diminuem, alguns animais sensíveis podem ter reflexos na saúde ou até morrer (USEPA, 2019). A maior concentração de OD foi observada no

viveiro da Fazenda 5 com valor absoluto de 8,98 mg L⁻¹. Nos demais viveiros, os valores variaram entre 6,92 a 8,50 mg L⁻¹. As altas concentrações observadas para as respectivas temperaturas estão sob provável influência da forte incidência de ventos na superfície aquática, baixa profundidade dos viveiros e um ambiente rico em algas. Resultados semelhantes com concentrações de OD variando entre 10,4 e 8 mg L⁻¹ foram obtidas por Chen et al. (2015) em viveiros de cultivo de camarão (*Fenneropenaeus penicillatus*), na Ilha de Hailing, Sul da China, com a temperatura da água em 28,19 e 29,87 °C, respectivamente. Em medições em superfície, valores de concentração maiores que 5 mg L⁻¹ são considerados os ideais para criação de camarões (ABCCAM, 2017b). De acordo com o CONAMA 357, apenas o ponto a jusante da Fazenda 3 ficou com concentração abaixo do padrão de 6 mg L⁻¹, recomendável para águas salinas Classe I. O baixo valor observado pode estar ligado ao ambiente lântico, baixo volume e a carga orgânica característica em canal de drenagem. A leitura de OD a montante da Fazenda 3, não foi apresentada por problema de memorização do dado na sonda Aquared (Tabela 10).

A condutividade é a medida da capacidade da água de passar uma corrente elétrica e está relacionada a presença de sais e outras substâncias inorgânicas dissolvidas na água. Altos valores em condutividade elétrica, pode indicar que o ambiente está sob influência de fontes de poluição. Entretanto, em águas salinas, a presença de íons ocorrendo naturalmente, fez desse parâmetro um controle de qualidade para análise de salinidade e para sólidos totais dissolvidos, diretamente relacionadas (USEPA, 2019). Os valores encontrados nos viveiros e nos pontos a montante e a jusante variaram respectivamente, de 70657 a 83946, de 50198 a 63497 e 37455 a 73463 $\mu\text{S cm}^{-1}$, todos coerentes com os valores encontrados para salinidade e sólidos totais dissolvidos (Tabela 10).

As análises de sólidos totais dissolvidos (STD) apresentaram maiores valores absolutos nos viveiros de engorda que nos demais pontos de coleta, e variaram de 45927 a 54564 mg L⁻¹, em razão principalmente da presença de resíduos de ração, carapaças, fezes dos camarões e biomassa de plâncton morta, acumulados durante o cultivo (ABCCAM, 2017a). As Fazendas 2 e 4 apresentaram valores absolutos de STD maiores a montante que a jusante, e variaram de 35482 e 37319 mg L⁻¹ para montante, contra 24345 e 34320 mg L⁻¹ a jusante, respectivamente. A Fazenda 1 apresentou menor valor para montante e maior valor para jusante, 38853 e 47750 mg L⁻¹. Os STD englobam matéria orgânica, minerais e substâncias

inorgânicas dissolvidas na água e a análise se relaciona diretamente com a condutividade elétrica e turbidez, sendo que maiores valores de condutividade elétrica e turbidez são esperados quando encontrados resultados com altos valores para STD. No entanto, na prática não foi observado essa correlação com a turbidez a jusante das Fazendas 3 e 4, pela provável presença de material particulado não dissolvido (Tabela 10).

O parâmetro de turbidez determina a dispersão de luz passada através de uma amostra. A turbidez é causada por matéria suspensa e coloidal, como argila e lodo, matéria orgânica, inorgânica e organismos microscópicos (USEPA, 2017b). Águas mais claras permitem que mais luz solar atinja a vegetação aquática submersa e melhore assim, os níveis de OD. A turbidez elevada provocada por atividades humanas, pode ser prejudicial aos ecossistemas aquáticos, sufocando os habitats costeiros, enterrando comunidades bentônicas e alterando os padrões de crescimento das algas (USEPA, 2019). A presença de 12 aeradores de palhetas no viveiro da Fazenda 1 contribuiu para turbidez de 82,80 NTU, o maior resultado em valor absoluto encontrado em viveiros. Nas demais fazendas, a variação dos viveiros foi de 5,1 a 41,7 NTU. Os pontos a montante variaram de 3,9 a 38,1 NTU e a jusante de 8,8 a 64,90 NTU (Tabela 10)

Salinidade (SAL) é o conteúdo de sal dissolvido em um corpo de água e um forte contribuinte para a condutividade. Excesso de salinidade pode ocorrer em áreas onde a evaporação é alta e há descargas de águas residuais. Níveis flutuantes de salinidade podem ser prejudiciais a comunidade aquática adaptadas às concentrações e variações toleradas. A salinidade tem papel na identificação se um determinado local de estudo é parte de um sistema estuarino ou costeiro (USEPA, 2019). Os resultados observados nos viveiros estiveram entre 35,32 a 41,97 ppt. Em medições em superfície, valores de 15 a 25 ppt e, em profundidade de 0,5 a 60 ppt, são considerados ideais para criação de camarões (ABCCAM, 2017b). De acordo com o CONAMA 357, águas salinas apresentam salinidade igual ou superior a 30 ppt. Se superior a 0,5 e inferior a 30 ppt são classificadas como salobras. As variações absolutas do padrão de águas salinas observadas entre os pontos a montante, viveiro e jusante das Fazendas 2, 3 e 4 se devem a presença de conexão de mangue e riachos na captação e drenagem, contribuindo para diluição da salinidade. As correções químicas necessárias a manutenção dos padrões de qualidade da água dos viveiros, além da condição de ambiente lântico e sob

influência de evaporação, podem ser a razão da salinidade nesses pontos terem sido maiores que nos demais a montante e a jusante estudados. A leitura da SAL a montante da Fazenda 3, não foi apresentada por problema de memorização do dado na sonda Aquared (Tabela 10).

5.7 Determinação de antibióticos em amostras de água

Em água, resíduos de SDM e FF foram os únicos antibióticos detectados e quantificados (Tabela 11). Considerando o fator de concentração do método de 1000 vezes, os resultados foram expressos em ng L^{-1} . A SDM foi exclusiva em viveiro da Fazenda 4 e foi detectada em concentração de $23,4 \text{ ng L}^{-1}$. O FF exibiu distribuição espacial e foi quantificado em viveiros, a montante e jusante nas Fazendas 1, 2 e 3. Entretanto, diante do comportamento observado no estudo de estabilidade, os resultados, principalmente em baixa concentração, podem estar sob influência de efeito matriz. Os resultados observados para FF nos pontos de viveiro ($169,16 \text{ ng L}^{-1}$) e a jusante ($21,35 \text{ ng L}^{-1}$) da Fazenda 1; viveiro ($175,77 \text{ ng L}^{-1}$), montante ($22,63 \text{ ng L}^{-1}$) e jusante ($58,15 \text{ ng L}^{-1}$) da Fazenda 2; e viveiro ($10,78 \text{ ng L}^{-1}$) e jusante ($21,18 \text{ ng L}^{-1}$) da Fazenda 3 apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). No comparativo dos resultados de FF entre fazendas e pontos de coleta, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os viveiros das Fazendas 1, 2 e 3. Os resíduos de FF a jusante da Fazenda 2 ($58,15 \text{ ng L}^{-1}$) foram superiores em concentração e únicos em diferença significativa ($p < 0,05$) no comparativo dos pontos a jusante. Resíduos de FF a montante foi observado apenas na Fazenda 2 em nível de $22,63 \text{ ng L}^{-1}$.

As amostras de viveiros das Fazendas 1 e 2 com concentrações acima da curva analítica, foram diluídas em proporção com solução de metanol e água (20:80, v/v) com 0,1% ácido fórmico, para ajuste das áreas dos picos na região central da curva analítica. Os fatores de diluição envolvidos foram considerados no cálculo das concentrações.

A prática de reutilização da água da lagoa de sedimentação pela Fazenda 2, pode ter sido a razão da retroalimentação do resíduo de FF evidenciado a montante (lagoa de captação) nessa propriedade. Além disso, dentre os pontos a jusante, foi o único a exibir diferença significativa ($p < 0,05$) comparado as demais fazendas.

Tabela 11 – Resíduos de antibióticos com detecção e quantificação

| Fazenda | Pontos de Coleta | Água | | Sedimentos | | | Músculo de Camarão | | | | |
|---------|------------------|--------------------|----------------------------|---------------------|-----|-----|---------------------|-----|-----|-----|----|
| | | SDM | FF | OTC | EFX | NFX | OTC | SDM | EFX | NFX | FF |
| | | ng L ⁻¹ | | µg kg ⁻¹ | | | µg kg ⁻¹ | | | | |
| 1 | V | - | 169,16 ± 2,52 ^B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M | - | - | - | <LQ | <LQ | - | - | - | - | - |
| | J | - | 21,35 ± 1,18 ^D | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | V | - | 175,77 ± 2,26 ^A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M | - | 22,63 ± 0,63 ^D | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | J | - | 58,15 ± 1,22 ^C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | V | - | 10,78 ± 0,64 ^E | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M | - | - | <LQ | <LQ | <LQ | - | - | - | - | - |
| | J | - | 21,18 ± 0,46 ^D | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | V | 23,4 ± 0,28 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | J | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | V | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | M/J | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

*V=Viveiro; M=montante dos viveiros; J=jusante dos viveiros; LQ=limite de quantificação; Os valores são representados pela média ± desvio padrão (n = 3). ^{A-E} Médias com diferentes sobrescritos em coluna são significativamente diferentes (p≤0,05). MSD = 3,8868, pelo teste de Tukey.

Já a ausência de retroalimentação do FF na Fazenda 1, pode estar relacionada as práticas diferenciadas de reutilização da água da lagoa de sedimentação, incluindo desde o atendimento de tempo de carência dos efluentes à proporções de reuso, fatores de diluição e condições melhoradas na degradação dos resíduos no local, tais como processos oxidativos, hidrólise, fotodegradação e biodegradação microbiana (KÜMMERER, 2009), que interferiram na detectabilidade analítica.

Na Fazenda 3, a concentração superior de FF a jusante, comparada ao viveiro, pode ter sido influenciada pela condição de ambiente lântico presente no canal de drenagem, baixo volume e evaporação favorecida pelas condições climáticas características do nordeste brasileiro, bem como a retroalimentação promovida pela ação das marés e a recepção de efluentes de outros viveiros.

Estudos recentes confirmam a variabilidade e opções de antibióticos empregados na carcinicultura (CHEN et al., 2015; LI et al., 2016; ZHANG et al., 2018; YUAN et al., 2019).

Resíduos de SDM detectados na Fazenda 4, não foram observados por Chen et al. (2015), em amostras de águas de viveiros de cultivo de camarão jovens e adultos (*Fenneropenaeus penicillatus*), na Ilha de Hailing, Sul da China. No entanto, identificaram amplo uso de OTC, TC e CFX em viveiro de camarões jovens. O maior nível detectado foi de OTC (15163 ng L⁻¹), seguido de TC (2305 ng L⁻¹) e CFX (186 ng L⁻¹).

No estudo de distribuição temporal de resíduos de EFX, NFX, TC, OTC e FF em amostras de água de viveiros de cultivo de camarão (*Litopenaeus vannamei*), na região da Baía de Hangzhou, Oeste da China, Yuan et al. (2019) verificaram maior abundância para NFX variando de 15,2 a 115,28 ng L⁻¹. Resíduos de EFX não foram detectados. A TC variou entre 9,89 a 34,11 ng L⁻¹ e OTC de 12,35 a 38,33 ng L⁻¹. Os resíduos de FF variaram de 0,48 a 47,97 ng L⁻¹ e foram semelhantes aos verificados para os pontos a jusante das Fazendas 1 e 3, porém inferiores quando comparado aos resultados dos viveiros das Fazendas 1 e 2.

Resíduos de FF observados por Li et al. (2016) em amostras de água de mangue de região com forte atividade em cultivo de peixes e camarões em Gaogiao, China, variaram de 0,15 a 34,8 ng L⁻¹ e foram semelhantes aos resultados dos pontos a jusante e montante das Fazendas 1, 2 e 3. No mesmo estudo, as amostras de água de mangue também apresentaram resíduos de CTC, OTC, TC, SMZ, CFX, EFX e NFX e variaram entre 9,38 (NFX) a 198 (CTC) ng L⁻¹.

No estudo de distribuição espacial e temporal dos resíduos de antibióticos em amostras de água de pisciculturas de tilápias (*Oreochromus niloticus*) de Santa Fé do Sul, São Paulo, Brasil, Monteiro et al. (2016), observaram uso de OTC e FF e perfil de diluição entre os pontos de coleta. Os resultados obtidos para os 4 tempos e 3 distâncias de amostragem, variaram entre 10 a 7993 ng L⁻¹ para OTC e 10 a 425 ng L⁻¹ para FF. Os resíduos de FF apresentados, com exceção do resultado de 425 ng L⁻¹, foram inferiores, comparados aos resultados obtidos para as águas de viveiros das fazendas criadoras de camarão 1 e 2.

A presença dessas porções remanescentes no ambiente somadas as particularidades das moléculas em não serem afetadas pelos efeitos imediatos de degradação biótica e abiótica, contribuem para a pressão seletiva e desenvolvimento da resistência microbiana e genes resistentes a antibióticos, duas preocupações de consequência de perda de eficácia dos compostos com impactos diretos na saúde pública e economia mundial. O tempo de tratamento de infecções por bactérias resistentes se prolongam e outros fármacos são exigidos, geralmente mais caros e mais tóxicos, e em alguns casos, não dão respostas a nenhum dos antibióticos conhecidos (KÜMMERER, 2009; DOYLE et al., 2013; CHEN et al., 2015; FAO, 2016b; ECDC, 2017; SU et al., 2017; SANTOS; RAMOS, 2018).

Cepas de bactérias do gênero *Vibrio*, espécies *V. cholerae*, *Vibrio coralliilyticus* e *V. parahaemolyticus* isoladas da água do estuário de Aracajú/CE – Brasil, região produtora de camarões (*Litopenaeus vannamei*) apresentaram múltipla resistência a perfis contendo florfenicol (25 µg) combinado a ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg) e nitrofurantoína (300 µg), além de oxitetraciclina (30 µg) e tetraciclina (30 µg) (ROCHA et al., 2016). Carvalho et al. (2013) identificaram cepas de *Salmonella* resistentes a ampicilina (>640 µg), oxitetraciclina (64-1024 µg), tetraciclina (64-256 µg) e nitrofurano (>12800 µg) em amostras de água e sedimentos coletados em lagoas de criação de camarões (*Litopenaeus vannamei*), localizadas no estuário do Rio Jaguaribe, cidade de Jaguaruana-CE, Brasil.

Su et al. (2017) identificaram em sistema de cultivo de camarões *Litopenaeus Vannamei* no sul da China, que genes (*sul1*, *qnrD*, *cmlA* e *floR*) responsáveis pela conferência de resistência aos antibióticos mais comuns, aumentam de 4 a 19 vezes no trato intestinal de camarões adultos quando comparado a camarões juvenis. Yuan et al. (2019) também detectaram abundância dos genes *sul1* e *tetC* em amostras de água e sedimentos de viveiros de cultivo de camarão (*Litopenaeus vannamei*), na região da Baía de Hangzhou, Oeste da China. No estudo de Elbashir et al. (2018), dados reforçam a probabilidade de patógenos resistentes serem veiculados pelos alimentos de origem marinha, visto os 1701 casos reportados de doenças transmitidas pelo consumo de alimentos contaminados por *V. parahaemolyticus*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*, ocorridos entre 1998 a 2015, nos Estados Unidos.

5.8 Determinação de antibióticos em amostras de sedimentos

Resíduos de OTC, EFX e NFX foram os únicos antibióticos detectados em sedimentos e tiveram ocorrência apenas nas Fazendas 1 e 3 a montante dos viveiros e em níveis < LQ. (Tabela 11). Entretanto, os resultados podem estar subestimados diante do comportamento observado no estudo de estabilidade e ao efeito matriz conferido para OTC nos ensaios de recuperação. A detecção dos antibióticos em sedimentos à montante das Fazendas 1 e 3, podem estar relacionados a acúmulos de retroalimentação das próprias fazendas ou de outras vias antropogênicas externas as propriedades, pelo fato da OTC e NFX serem de uso comum na saúde humana. Soma-se ainda, a influência e capacidade diminuta das fluoroquinolonas na degradação biótica e abiótica (RUSU et al., 2014; LI et al., 2016). Segundo, Seifrtová et al. (2009), Zhou-lj et al. (2012) e University of Hertfordshire (2019), diferente das sulfonamidas e anfenicóis, os antibióticos das classes das tetraciclinas e fluoroquinolonas são mais propensos ao fenômeno de sorção e baixa mobilidade em solos e sedimentos. A persistência de antibióticos em sedimentos marinhos varia de >185 dias para OTC (HOSSAIN; UDDIN; FAKHRUDDIN, 2013) e > 21 dias para NFX (THUY et al., 2013).

A não detecção dos antibióticos SDM e FF em sedimentos pode ter sido diretamente influenciada pela profundidade empregada na coleta. Por serem moléculas com características de mobilidade, as concentrações superficiais ao diminuir pela lixiviação podem ter trazido impactos na detecção e quantificação analítica. Baseado no coeficiente de adsorção normalizado pelo carbono orgânico (K_{oc}) e na solubilidade em água, SDM é levemente móvel em solos ($K_{oc}=1672$) e moderadamente solúvel em água a 20 °C (343 mg L⁻¹). Já o FF tem alta solubilidade (1320 mg L⁻¹) e alta mobilidade ($K_{oc}=38$), (UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE, 2019). Os antibióticos da classe das sulfonamidas (SAs) e alguns dos anfenicóis, como FF, são móveis no solo devido à sua baixa capacidade de sorção, (SEIFRTOVÁ et al., 2009; ZHOU-LJ et al., 2012; UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE, 2019). Além disso, as SAs são persistentes e prevalecem em meio aquático (LI et al., 2014; LI et al., 2018b).

Em sistemas aquáticos a distribuição de antibióticos nas fases água-sedimento é dependente das propriedades físico-químicas dos compostos, do carbono orgânico total, pH e salinidade da água, bem como do teor de carbono

orgânico, textura, diâmetro das partículas e capacidade de troca catiônica dos sedimentos. A matéria orgânica desempenha um papel importante na regulação da distribuição de antibióticos entre as fases água-sedimento, provavelmente devido à complexação de antibióticos com grupos funcionais de superfície. Quanto menor o diâmetro das partículas dos sedimentos, maior é a superfície de contato e sítios de sorção. Materiais particulados suspensos na coluna d'água interferem na sorção em sedimentos e diminuiu a concentração de antibióticos na fase água. (ZHOU-JL et al., 2012; LIANG et al., 2013; SHI et al., 2014; CHEN et al., 2015; LI et al., 2016; LI et al., 2018b).

Um total de nove antibióticos do escopo analítico do presente estudo (CTC, OTC, TC, SMZ, CFX, EFX, NFX, CAP e FF) foram detectados por Li et al. (2016) em sedimentos superficiais (0-5 cm) de mangue de Gaogiao-China, região de cultivo de peixes e camarões. Comparados aos resultados de OTC, EFX e NFX, detectados em níveis <LQ a montante das Fazendas 1 e 3, os resíduos variaram de 1,55 a 17,5 (OTC); 24,4 a 444 (EFX) e 6,29 a 459 (NFX) $\mu\text{g kg}^{-1}$ nos sedimentos de mangue. Os demais resíduos foram detectados com variações entre 0,08 (FF) a 158 (CFX) $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Assim como observado para os resultados de SDM e FF em sedimentos e águas nos pontos das Fazendas 1, 2, 3 e 4, no estudo de Chen et al. (2015), também não foram detectados em sedimentos (0-30 cm), os resíduos de OTC (15163 ng L^{-1}), TC (2305 ng L^{-1}) e CFX (186 ng L^{-1}), detectados em água de viveiros de criação de camarão (*Fenneropenaeus penicillatus*) na Ilha de Hailing, Sul da China, evidenciando as complexidades dos ambientes aquáticos na distribuição de antibióticos nas fases água-sedimento.

No estudo de distribuição temporal de resíduos de antibióticos em amostras de sedimentos (0-10 cm) de viveiros de cultivo de camarão (*Litopenaeus vannamei*) da região da Baía de Hangzhou, Oeste da China, Yuan et al. (2019), obtiveram resultados superiores para os resíduos de EFX, NFX e OTC comparados aos observados a montante das Fazendas 1 e 2, e variaram de 0,23 a 2,05 para EFX; 5,20 a 13,60 para NFX e 0,75 a 4,36 ng g^{-1} para OTC. Resíduos de NFX foram os mais abundantes dentre os resíduos avaliados na distribuição temporal em sedimentos e água. Apesar de não terem sido detectados em água de viveiros, resíduos de EFX foram detectados em sedimentos nos 3 meses de avaliação.

Os antibióticos, TC e FF tiveram ocorrência tanto na água dos viveiros quanto em sedimentos e variaram entre 0,84 a 5,42 (TC) e 0,1 a 2,05 (FF) ng g⁻¹.

Resíduos de OTC foram predominantes no estudo em sedimentos de pisciculturas de tilápias (*Oreochromus niloticus*) de Santa Fé do Sul, São Paulo, Brasil, realizado por Monteiro et al. (2016). Na avaliação da distribuição espacial e temporal, os resultados obtidos para OTC nos 4 tempos e 3 distâncias de amostragem, variaram entre 11 a 7343 µg kg⁻¹.

5.9 Determinação de antibióticos em amostras de camarão

Não houve detecção de nenhum dos antibióticos avaliados em músculo de camarão (Tabela 11). A ausência verificada, inclusive para os resíduos de SDM e FF, detectados em água, evidenciaram os preparativos para a fase de despesca da produção e o atendimento dos tempos de carência, pós-aplicação dos antibióticos nos viveiros. De acordo com Rico et al. (2013), as recomendações de uso de FF em cada ciclo de cultivo de camarões, é de 10-20 mg kg⁻¹ de peso corpóreo, em período de 5 a 7 dias de tratamento. As diferenças verificadas de ausência e presença dos resíduos, no tecido muscular e na água dos viveiros, é devido às características de complexidade intrínsecas das matrizes e as influências que exercem na sensibilidade analítica, (LQs em µg kg⁻¹ e ng mL⁻¹), além dos fatores associados de metabolização das moléculas após ingestão do animal. Diferentes autores afirmam que até 90% da dose de antibióticos administrada tanto em humanos como em animais podem ser excretadas na forma original ou pouco metabolizadas (SARMAH et al., 2006; KÜMMERER, 2009); REGITANO; LEAL, 2010; GAO et al., 2012a; PAN; CHU, 2017; FAO, 2017a).

Resultados semelhantes para SDM e FF observados nas Fazendas 1, 2, 3 e 4, foram obtidos por Zhang et al. (2018), em amostras de água, sedimentos e músculo de camarão (*Litopenaeus vannamei*) variando em pesos de 3,2 a 40,3 g, coletados em viveiros de cultivo de 7 fazendas produtoras da região do Golfo de Beibu, China. Resíduos de SDM e FF estiveram presentes apenas na matriz água e variaram de <LQ a 1,88 e 3,73 a 578 ng L⁻¹, respectivamente. Observaram ainda distribuição espacial e perfil de diluição de resíduos de FF nas proximidades de 4 pontos de coleta de água de estuário, 2 pontos costeiros e em 3 de mar aberto, variando entre 4,92 a 460; 5,08 a 5,2 e 0,40 a 0,51 ng L⁻¹, respectivamente.

Foram também detectados nos viveiros, SMZ em água e camarões; NFX, CFX e EFX nas três matrizes; e CAP em água e sedimentos. Todos os resíduos dos antibióticos em cada matriz variaram de <LQ a 182 ng L⁻¹ (CFX) em água; <LQ a 52,5 ng g⁻¹ (NFX) em sedimentos, e <LQ a 4,4 ng g⁻¹ (NFX) em camarões.

No estudo de Chen et al. (2015), resíduos de OTC foram detectados em músculo de camarão jovens (32,1 ng g⁻¹) e na água (15163 ng L⁻¹) de viveiros de cultivo de camarão (*Fenneropenaeus penicillatus*) na Ilha de Hailing, Sul da China. No entanto, não observaram em músculo, os resíduos de TC (2305 ng L⁻¹) e CFX (186 ng L⁻¹) detectados na água. Detectaram também resíduos de EFX em camarão jovens (149 ng g⁻¹) e adultos (1,5 ng g⁻¹).

Resíduos de OTC e FF foram observados por Monteiro et al. (2015) em tecido muscular de tilápias (*Oreochromus niloticus*) coletadas de 4 pisciculturas de importante região produtora do Estado de São Paulo, Brasil. Dentre as 36 amostras avaliadas, 9 apresentaram resíduos de OTC variando entre 15,6 a 1231,8 µg kg⁻¹ e com casos de valores acima do LMR estabelecido pelo PNCRC/Animal-MAPA para peixe de cultivo (200 µg kg⁻¹). Resíduos de FF variaram entre 521,8 a 528 µg kg⁻¹, e ficaram abaixo do LMR do mesmo programa de monitoramento brasileiro (1000 µg kg⁻¹).

Resultados de análises oficiais realizadas pelo programa brasileiro de monitoramento de resíduos de antibióticos em camarões de cultivo (PNCRC/Animal-MAPA), comparados ao escopo do presente estudo, apontaram atendimentos dos LMRs em 610 amostras de músculo analisadas nos últimos 8 anos (dados de 2010 a 2017). Entretanto, os dados não exibem a variação dos resultados abaixo dos LMRs, dificultando uma interpretação mais detalhada (BRASIL, 2019b). A detecção de EFX e NFX (<LQ) em sedimentos a montante das Fazendas 1 e 3 (Tabela 11), sugerem uma contínua investigação e possível inclusão dos compostos na lista de monitoramento pelo PNCRC/Animal, a fim de garantir a segurança alimentar dos consumidores, dada as características de persistência da classe das FQs e recente banimento em produtos da aquicultura pelos Estados Unidos e Canadá (RICO et al., 2013; CHEN et al., 2015).

6 CONCLUSÕES

Os métodos cromatográficos tiveram recuperações satisfatórias para a maioria dos antibióticos, com exceções das tetraciclinas (OTC e TC) em água e sedimentos, e das fluoroquinolonas (CFX, NFX e SAR) em água, sinalizando oportunidades para novas otimizações em preparo e extração das amostras.

Os antibióticos exibiram diferentes estabilidades em função da classe química, concentração, tipo de matriz e tempo de armazenamento. A classe das sulfonamidas foram estáveis em água e em músculo de camarão. O FF exibiu pelo menos 1 episódio de estabilidade em cada uma das matrizes. Da classe das tetraciclinas, CTC e TC, apresentaram estabilidade nas 3 matrizes avaliadas. O antibiótico OTC, foi o mais instável, entre as matrizes e variáveis envolvidas no estudo, seguido das fluoroquinolonas, CFX e NFX.

Resíduos de antibióticos foram detectados em 4 das 5 fazendas avaliadas, predominando nos sistemas intensivo e semi-intensivo de produção. Não houve detecção de resíduos na fazenda com sistema de produção extensivo.

Resíduos de SDM e FF foram os únicos antibióticos detectados e quantificados em água de viveiros de cultivo.

Resíduos de OTC, EFX e NFX, foram detectados em sedimentos apenas em pontos à montante dos viveiros e em níveis <LQ.

Não houve detecção de nenhum dos 12 antibióticos avaliados em camarão.

Resíduos de FF tiveram distribuição espacial em amostras de água das Fazendas 1, 2 e 3.

Estiveram sob efeito de instabilidade e efeito matriz, os resultados de FF (< 60 ng L⁻¹) em amostras reais de água acondicionada em cartuchos SPE, além de OTC, EFX e NFX (< LQ) em sedimentos.

Com exceção dos parâmetros físico-químicos de OD e salinidade, os parâmetros de temperatura e pH tiveram pequenas variações às especificações de cultivo de camarões (*Litopenaeus vannamei*). Variações de baixa magnitude foram observadas para pH e OD perante às especificações da resolução 357 de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) para águas salinas Classe I.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A não detecção de nenhum dos 12 antibióticos avaliados em camarão, evidenciaram os preparativos para a fase de despesca da produção e o atendimento dos tempos de carência, necessários a segurança alimentar.

A ocorrência de FF à montante numa das fazendas, está sob provável influência do fator de retroalimentação promovido pela lagoa de sedimentação presente na propriedade.

A detecção de EFX e NFX (<LQ) em sedimentos à montante de 2 fazendas, sugerem a inclusão dos compostos no programa do PNCRC/Animal (MAPA) para o monitoramento em camarões de cultivo.

Por apresentar particularidades em uso e épocas, estudos para avaliação temporal dos resíduos são recomendados, incluindo outros de ordem de segurança alimentar, como de avaliação da presença de patógenos e genes resistentes na fase de despesca.

Os pontos de captação de água de abastecimento e drenagem dos efluentes, auxiliam atividades exploratórias e entendimento do comportamento e distribuição dos antibióticos em uso nas fazendas de cultivo de camarão.

REFERÊNCIAS

AOAC INTERNATIONAL. **AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals**. Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals. 19. ed. Gaithersburg, MD, 2013. 32 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO – ABCC. **Curso de boas práticas de manejo e biossegurança**: Fazendas de engorda nível II. Natal, 2017. 75 p. 2017a. Disponível em: <http://abccam.com.br/2017/08/curso-de-boas-praticas-de-manejo-e-biosseguranca-fazendas-de-engorda-nivel-ii/>. Acesso em: 04 jan. 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO – ABCC. **Procedimentos de Boas Práticas de Manejo e Medidas de Biossegurança para Carcinicultura Brasileira**. Natal, 2012. 49 p. Disponível em: <http://abccam.com.br/site/wp-content/uploads/2014/01/Manual-de-Boas-Praticas-de-Manejo-e-Biosseguranca.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO – ABCC. **Técnicas de manejo e qualidade da água com ênfase no seu balanço iônico**. Natal, 2017. 57 p. 2017b. Disponível em: <http://abccam.com.br/wp-content/uploads/2017/07/APOSTILA-TÉCNICAS-DE-MANEJO-E-QUALIDADE-DA-ÁGUA-COM-ÊNFASE-NO-SEU-BALANÇO-IÔNICO.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2019.

BONFILIO, R.; CAZEDEY, E. C. L.; DE ARAÚJO, M. B.; SALGADO, H. R. N. Analytical validation of quantitative high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis: a practical approach. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Boca Raton, v. 42, p. 87-100, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Resistência aos antimicrobianos**. Brasília, DF, 2019a. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/programas-especiais/resistencia-antimicrobianos>. Acesso em: 04 jan. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes**. Resultados PNCRC/Animal – 2010-2017. 2019b. 12 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>. Acesso em: 07 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 09, de 21 de fevereiro de 2017. Plano de amostragem e limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC de 2017 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 mar. 2017. Seção 1, n. 46, p. 4. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/pncrc-2017.pdf>. Acesso em: 07 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA/MAA 42/1999. Plano Nacional do Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado – PCRP. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 dez. 1999. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>. Acesso em: 07 mar. 2019.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, de 18 mar. 2005, n. 53, p. 58-63.

BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY. **Review on antimicrobial resistance**. Tackling drug-resistant infections globally. London, 2016. Disponível em: <https://amr-review.org/>. Acesso em: 07 jan. 2019.

CABELLO, F.; GODFREY, H.; TOMOVA, A.; IVANOVA, L.; DÖLZ, H.; MILLANAO, A.; BUSCHMANN, A. H. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 15, n. 7, p. 1917-42, 2013.

CAÑADA-CAÑADA, F.; DE LA PEÑA, A.; ESPINOSA-MANSILLA, A. Analysis of antibiotics in fish samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 395, p. 987–1008, 2009. DOI 10.1007/s00216-009-2872-z

CARLSON, J. C.; CHALLIS, J. K.; HANSON, M. L.; WONG, C. S. Stability of pharmaceuticals and other polar organic compounds stored on polar organic chemical integrative samplers and solid-phase extraction cartridges. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 32, n. 2, p. 337–344, 2013

CARVALHO, F. C. T.; SOUSA, O. V.; CARVALHO, E. M. R.; HOFER, E.; VIEIRA, R. H. S. F. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. isolated from shrimp farming freshwater environment Northeast Region of Brazil. **Journal of Pathogens**, New York, v. 2013, art. 685193, 5 p., 2013. DOI: 10.1155/2013/685193.

CARVALHO, I. T.; SANTOS, L. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. **Environment International**, New York, v. 94, p.736–757, 2016.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CHANDRAN, S.; SINGH, R. S. P. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. **Pharmazie**, Berlin, v. 62, n. 1, p. 4-14, 2007.

CHEN, H.; LIU, S.; XU, X.; LIU, S.; ZHOU, G.; SUN, K.; ZHAO, J.; YING, J. Antibiotics in typical marine aquaculture farms surrounding Hailing Island, South China: Occurrence, bioaccumulation and human dietary exposure. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 90, p. 181-187, 2015.

CHEN, K.; ZHOU, J.L. Occurrence and behavior of antibiotics in water and sediments from the Huangpu River, Shanghai, China. **Chemosphere**, Oxford, v. 95, p. 604–612, 2014.

CHEN, Y. H.; HE, J. G. Effects of environmental stress on shrimp innate immunity and white spot syndrome virus infection. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 84, p. 744–755, 2019.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (MRLs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods**. Updated as at the 38th Session of the Codex Alimentarius Commission. Rome, 2015. 41 p. (CAC/MRL 2-2015).

COSTA, R. A.; ARAÚJO, R. L.; SOUZA, O. V.; VIEIRA, R. H. S. F. Antibiotic-resistant vibrios in farmed shrimp. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, art. ID 505914, 5 p., 2015. doi: 10.1155/2015/505914.

CZEKALSKI, N.; GASCÓN, D. E.; BÜRGMANN, H. Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. **The ISME Journal**, London, v. 8, p.1381–90, 2014.

DENG, W.; LI, N.; ZHENG, H.; LIN, H. Occurrence and risk assessment of antibiotics in river water in Hong Kong. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 125, p. 121-127, 2016.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. LC–MS² trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 24, n. 7, p. 645-657, 2005.

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

DONE, H. Y.; VENKATESAN, A. K.; HALDEN, R. U. Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture? **The AAPS Journal**, Arlington, v. 17, n. 3, p. 513–24, 2015.

DOYLE, M. P.; LONERAGAN, G. H.; MORGAN S. H.; SINGER, R. S. Antimicrobial Resistance: Challenges and Perspectives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, vol. 12, p. 234-248, 2013. doi: 10.1111/1541-4337.12008

DUAN, Y.; LIU, Q.; WANG, Y.; ZHANG, J.; XIONG, D. Impairment of the intestine barrier function in *Litopenaeus vannamei* exposed to ammonia and nitrite stress, **Fish Shellfish Immunology**, London, v. 78, p. 279–288, 2018.

DUFRESNE, G.; FOUQUET, A.; FORSYTH, D.; TITTEMIER, S. A. Multiresidue determination of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in fish and shrimp by liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of AOAC Internacional**, Arlington, v. 90, n. 2, p. 604-612, 2007.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL - ECDC. **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015**. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC, 2017.

ELBASHIR, S.; PARVEEN, S.; SCHWARZ, J.; RIPPEN, T.; JAHNCKE, M.; DEPAOLA, A. Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: A review. **Food Microbiology**, London, v. 70, p. 85-93, 2018.

EURACHEM. **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. 2. ed. Torino, 2014. Disponível em: www.eurachem.org. Acesso em: 07 mar. 2019.

EUROPEAN COMMISSION. Directorate General for Health and Food Safety. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed**. Luxembourg, 2017. 46 p. (SANTE/11813/2017).

EUROPEAN MEDICINES AGENCY – EMEA. **Guidance on Bioanalytical Method Validation**. London, 2011.

FAO. **Antimicrobial resistance in fod and agriculture**. Rome, 2017a. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i7138e.pdf>. Acesso em: 21 maio 2017.

FAO. **Antimicrobial resistance**. Key facts. Rome, 2017b. Disponível em: <http://www.fao.org/antimicrobial-resistance/background/what-is-it/en/>. Acesso em: 21 maio 2017.

FAO. Fisheries and Aquaculture Department. **Cultured Aquatic Species Information Programme: *Penaeus vannamei*** (Boone, 1931). Rome, 2019. Disponível em: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/en. Acesso em: 07 jan. 2019.

FAO. **The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020**. Rome, 2016a. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5996e.pdf>. Acesso em: Acesso em: 21 maio 2017.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2008**. Rome, 2009. 196 p. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i0250e.pdf>. Acesso em: Acesso em: 21 maio 2017.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**. Contributing to food security and nutrition for all. Rome, 2016b. 200 p. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Acesso em: Acesso em: 21 maio 2017.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018**. Meeting the sustainable development goals. Rome, 2018. 227 p. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i9540en/I9540EN.pdf>. Acesso em: 07 jan. 2019.

FEDOROVA, G.; NEBESKY, V.; RANDAK, T.; GRABIC, R. Simultaneous determination of 32 antibiotics in aquaculture products using LC-MS/MS. **Chemical Papers**, London, v. 68, n. 1, p. 29–36, 2014. DOI: 10.2478/s11696-013-0428-3

FERNANDEZ-TORRES, R.; LOPEZ, M. A. B.; CONSENTINO, M. O.; MOCHON, M. C.; PAYAN, M. R. Enzymatic-microwave assisted extraction and high-performance liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of selected veterinary antibiotics in fish and mussel samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 54, p. 1146–1156, 2011.

FERREIRA, N. C.; BONETTI, C.; SEIFFERT, W. Q. Hydrological and Water Quality Indices as management tools in marine shrimp culture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 318, p. 425–433, 2011.

FLEGEL, T. W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 110, p. 166-173, 2012.

FRANKLIN, A. M.; AGA, D. S.; CYTRYN, E.; DURSO, L. M.; MCLAIN, J. E.; PRUDEN, A.; ROBERTS, M. C.; ROTHROCK, MICHAEL J. J.; SNOW, D. D.; WATSON, J. E.; DUNGAN, R. S. Antibiotics in Agroecosystems: Introduction to the Special Section. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 45, p. 377-393, 2016. Special section. doi:10.2134/jeq2016.01.0023

FURUSHITA, M.; SHIBA, T.; MAEDA, T.; YAHATA, M.; KANEOKA, A.; TAKAHASHI, Y.; TORII, K.; HASEGAWA, T.; OHTA, M. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, p. 5336–5342, 2003.

GAO, L.; SHI, Y.; LI, W.; LIU, J.; CAI, Y. Occurrence, distribution and bioaccumulation of antibiotics in the Haihe River in China. **Journal of Environmental Monitoring**, Cambridge, v.14, p. 1248–1255, 2012a. DOI: 10.1039/c2em10916f

GAO, L.; SHI, Y.; LI, W.; NIU, H.; LIU, J.; CAI, Y. Occurrence of antibiotics in eight sewage treatment plants in Beijing, China. **Chemosphere**, Oxford, v. 86, p. 665-671, 2012b.

GBYLIK-SIKORSKA, M.; POSYNIAK, A.; SNIEGOCKI, T.; ZMUDZKI, J. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry multiclass method for the determination of antibiotics residues in water samples from water supply systems in food-producing animal farms. **Chemosphere**, Oxford, v. 119, p. 8-15, 2015.

GRASLUND, S.; HOLMSTROM, K.; WAHLSTROM, A. A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farming. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 46, p. 81–90, 2003.

GROS, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1292, p. 173-188, 2013.

HANEKAMP, J. C.; BAST, A. Antibiotics exposure and health risks: Chloramphenicol. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 39, p. 213–220, 2015.

HILLEBRAND, O.; MUSALLAM, S.; SCHERER, L.; NÖDLER, K.; LICHA, T. The challenge of sample-stabilisation in the era of multi-residue analytical methods: A practical guideline for the stabilisation of 46 organic micropollutants in aqueous samples. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 454–455, p. 289–298. 2013.

HOLMSTROM, K.; GRASLUND, S.; WAHLSTROM, A.; POUNGSHOMPOO, S.; BENGTSSON, B. E.; KAUTSKY, N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **International Journal of Food Science and Technology**, Chichester, v. 38, p. 255–266, 2003.

HONG, Y.; SHARMA, V. K.; CHIANG, P. C.; KIM, H. Fast-target analysis and hourly variation of 60 pharmaceuticals in wastewater using uplc-high resolution mass spectrometry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 69, p. 525–534, 2015. DOI 10.1007/s00244-015-0214-z

HOSSAIN, M. S.; UDDIN, M. J.; FAKHRUDDIN, A. N. M. Impacts of shrimp farming on the coastal environment of Bangladesh and approach for management. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, Dordrecht, v.12, p.313–332, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 1-108, 2013. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=784>. Acesso em: 07 jan. 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 1-39, 2014. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=784>. Acesso em: 07 jan. 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 43, p. 1-49, 2015. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=784>. Acesso em: 07 jan. 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 44, p. 1-51, 2016. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=784>. Acesso em: 07 jan. 2019.

ICH - HARMONISATION FOR BETTER HEALTH. **Analytical procedure development and guideline on validation of analytical procedures: Q2(R2)/Q14**. Geneva, 2018. Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_Q14/Q2R2Q14EWG_ConceptPaper_2018_1115.pdf. Acesso em: 07 jan. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro: Coordenação Geral de Acreditação – CGCRE, 2018a. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=C_alibEnsaios. Acesso em: 07 jan. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. **NIT-DICLA-026 - Requisitos para a Participação de Laboratórios em Atividades de Ensaio de Proficiência**. Rio de Janeiro: Coordenação Geral de Acreditação – CGCRE, 2018b. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=C_alibEnsaios. Acesso em: 07 jan. 2019.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY – IUPAC. **Harmonized Guidelines for single-laboratory validation of method of analyses**. (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, London, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

JIANG, C.; CAI, H.; CHEN, L.; CHEN, L.; CAI, T. Effect of forestry-waste biochars on adsorption of Pb(II) and antibiotic florfenicol in red soil. **Environmental Science and Pollution Research International**, Landsberg, v. 24, p. 3861–3871, 2017. DOI 10.1007/s11356-016-8060-8

JUSTINO, C. I. L.; DUARTE, K. R.; FREITAS, A. C.; PANTELEITCHOUK, T. S. L.; DUARTE, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. A. P. Contaminants in aquaculture: Overview of analytical techniques for their determination. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 80, p. 293–310, 2016.

KAESEBERG, T.; ZHANG, J.; SCHUBERT, S.; OERTEL, R.; KREBS, P. Abiotic, biotic and photolytic degradation affinity of 14 antibiotics and one metabolite e batch experiments and a model framework. **Environmental Pollution**, London, v. 241, p. 339-350, 2018.

KIM, C.; RYU, H. D.; CHUNG, E. G.; KIM, Y.; LEE, J. K. A review of analytical procedures for the simultaneous determination of medically important veterinary antibiotics in environmental water: Sample preparation, liquid chromatography, and mass spectrometry. **Journal of Environmental Management**, London, v. 217, p. 629-645, 2018.

KING, T.; COLE, M.; FARBER, J. M.; EISENBRAND, G.; ZABARAS, D.; FOX, E. M.; HILL, J. P. Food safety for food security: Relationship between global megatrends and developments in food safety. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 68, p. 160-175, 2017.

KRUVE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M. L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 870, p. 29-44, 2015a.

KRUVE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M. L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 870, p. 8-28, 2015b.

KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 417-434, 2009.

LAI, H. et al. Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. **Fish & Shellfish Immunology**. London, v. 47, p. 1006-1014, 2015.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 5, n. 1, p. 27-46, 2013. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2013.005>

LI, H.; KIJAK, P. J. Development of a quantitative multiclass/multiresidue method for 21 veterinary drugs in shrimp. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 94, p. 394-406, 2011.

LI, N.; ZHANG, X.; WU, W.; ZHAO, X. Occurrence, seasonal variation and risk assessment of antibiotics in the reservoirs in North China. **Chemosphere**, Oxford, v. 111, p. 327–335, 2014.

LI, S.; SHI, W.; LI, H.; XU, N.; ZHANG, R.; CHEN, X.; SUN, W.; WEN, D.; HE, S.; PAN, J.; HE, Z.; FAN, Y. Antibiotics in water and sediments of rivers and coastal area of Zhuhai City, Pearl River estuary, south China. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 636, p. 1009–1019, 2018a.

LI, S.; SHI, W.; LIUC, W.; LI, H.; ZHANG, W.; HU, J.; KE, Y.; SUN, W.; NI, J. A duodecennial national synthesis of antibiotics in China's major rivers and seas (2005–2016). **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 615, p. 906-917, 2018b.

LI, W.; SHI, Y.; GAO, L.; LIU, J.; CAI, Y. Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. **Chemosphere**, Oxford, v. 89, p. 1307-1315, 2012.

LI, Y.; LI, Q.; ZHOU, K.; SUN, X.; ZHAO, L.; ZHANG, Y. Occurrence and distribution of the environmental pollutant antibiotics in Gaoqiao mangrove area, China. **Chemosphere**, Oxford, v. 147, p. 25-35, 2016.

LIANG, X.; CHEN, B.; NIE, X.; SHI, Z.; HUANG, X.; LI, X. The distribution and partitioning of common antibiotics in water and sediment of the Pearl River Estuary, South China. **Chemosphere**, Oxford, v. 92, p. 1410–1416, 2013.

LIU, X.; STEELE, J. C.; MENG, X. Z. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: A review. **Environmental Pollution**, London, v. 223, p. 161-169, 2017.

LIU, X.; ZHANG, H.; LI, L.; FU, C.; TU, C.; HUANG, Y.; WU, L.; TANG, J.; LUO, Y.; CHRISTIE, P. Levels, distributions and sources of veterinary antibiotics in the sediments of the Bohai Sea in China and surrounding estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 109, p. 597–602, 2016.

LLORCAA, M.; GROSA, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZA, S.; BARCELÓ, D. Sample preservation for the analysis of antibiotics in water. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1369, p. 43–51, 2014.

MARON, D. F.; SMITH, T. J. S.; NACHMAN, K. E. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. **Globalization and Health**, London, v. 9, n. 48, p. 11, 2013. doi: 10.1186/1744- 8603- 9- 48.

MCCLURE, E. L.; WONG, C. S. Solid phase microextraction of macrolide, trimethoprim, and sulfonamide antibiotics in wastewaters. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1169, p. 53-62, 2007.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, São Paulo, v. 40, n. 9, p. 1094-1110, 2017.

MONTEIRO, S. H.; FRANCISCO, J. G.; ANDRADE, G. C. R. M.; BOTELHO, R. G.; FIGUEIREDO, L. A.; TORNISIELO, V. L. Study of spatial and temporal distribution of antimicrobial in water and sediments from caging fish farms by on-line SPE-LC-MS/MS. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, New York, v. 51, n. 9, p. 634–643, 2016.

MONTEIRO, S. H.; FRANCISCO, J. G.; CAMPION, T. F.; PIMPINATO, R. F.; ANDRADE, G. C. R. M.; GARCIA, F.; TORNISIELO, V. L. Multiresidue antimicrobial determination in Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) cage farming by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 447, p. 37-43, 2015.

PAN, M.; CHU, L.M. Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 599–600, p. 500–512, 2017.

PEARCE, J. N.; BURNS, B. G.; RIET, J. M. V.; CASEY, M. D.; POTTER, R. A. Determination of fluoroquinolones in aquaculture products by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), **Food Additives and Contaminants: Part A**, London, v. 26, p. 39-46, 2009.

PETROVIC, M. Methodological challenges of multi-residue analysis of pharmaceuticals in environmental samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 1, p. 25–33, 2014.

PIMENTEL, M. F. Calibração: Uma revisão para Químicos Analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.

PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; FRIGGI, C. A.; MUNARETTO, J. S.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. O Estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 5, p. 697-710, 2013.

QUESADA, S. P.; PASCHOAL, J. A. R.; REYES, F. G. R. Considerations on the Aquaculture Development and on the Use of Veterinary Drugs: Special Issue for Fluoroquinolones - A Review. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 78, n. 9, p. 1321-1333, 2013.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p. 601-616, 2010.

REZK, M. R.; RIAD, S. M.; KHATTAB, F. I.; MARZOUK, H. M. Multi-residues determination of antimicrobials in fish tissues by HPLC–ESI-MS/MS method. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 978–979, p. 103–110, 2015.

RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C. Planilha de Validação: uma nova Ferramenta para Estimar Figuras de Mérito na Validação de Métodos Analíticos Univariados. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RIBEIRO, L. F.; DE SOUZA, M. M.; BARROS, F.; HATJE, V. Desafios da carcinicultura: aspectos legais, impactos ambientais e alternativas mitigadoras. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, Lisboa, v. 14, n. 3, p. 365-383, 2014.

RICHARDS, G. P. Bacteriophage remediation of bacterial pathogens in aquaculture: a review of the technology, **Bacteriophage**, Austin, v. 4, n. 4, e. 975540, 2014. DOI: 10.4161/21597081.2014.975540

RICO, A.; PHU, T. M.; SATAPORNVANIT, K.; JIANG, M.; SHAHABUDDIN, A. M.; HENRIKSSON, P. J. G.; MURRAY, F. J.; LITTLE, D. C.; DALSGAARD, A.; BRINK, P. J. V. D. Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 412-413, p. 231-243, 2013.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1153, n. 1-2, p. 36-53, 2007.

ROCHA, I. P. Setor carcinícola, aquícola e pesqueiro: potencialidades, desafios e oportunidades para uma efetiva contribuição com o fortalecimento da sócia economia pesqueira do Brasil. **Revista da ABCC - Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, Nata, v. 20, n. 2, p. 1-72, 2018.

ROCHA, R. S.; SOUZA, O. V.; VIEIRA, R. H. S. Multidrug-resistant *Vibrio* associated with an estuary affected by shrimp farming in Northeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 105, p. 337-340, 2016.

RUSU, A.; HANCU, G.; UIVAROS, I. V. Fluoroquinolone pollution of food, water and soil, and bacterial resistance. **Environmental Chemistry Letters**, Secaucus, v. 13, p. 21-36, 2014.

SAMUELSEN, O. B.; LUNESTADB, B. T.; ERVIK, A.; FJELDE, S. Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 126, p. 283-290, 1994.

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

SANTOS, L.; RAMOS, F. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 52, p. 135–143, 2018.

SAPKOTA, A.; SAPKOTA, A. R.; KUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER, P.; LAWRENCE, R. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, Oxford, v. 34, p. 1215–1226, 2008.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 725-759, 2006.

SAXENA, S. K.; RANGASAMY, R.; KRISHNAN, A. A.; SINGHB, D. P.; UKEB, S. P.; MALEKADIB, P. K.; SENGARC, A. S.; MOHAMED, D. P.; GUPTA, A. Simultaneous determination of multi-residue and multi-class antibiotics in aquaculture shrimps by UPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, Barking, v. 260, p. 336–343, 2018.

SCOTT, A. M.; BELLER, E.; GLASZIOU, P.; CLARK, J.; RANAKUSUMA, R. W.; BYAMBASUREN, O.; BAKHIT, M.; PAGE, S. W.; TROTT, D.; DEL-MAR, C. Is antimicrobial administration to food animals a direct threat to human health? A rapid systematic review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 52 p. 316–323, 2018.

SEIFRTOVA, M.; NOVAKOVA, L.; LINO, C.; PENA, A.; SOLICH, P. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental Waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 649, p.158–179, 2009.

SERRA-COMPTE, A.; ALVAREZ-MUNOZ, D.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELO, D. Multi-residue method for the determination of antibiotics and some of their metabolites in seafood. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 104, p. 3-13, 2017.

SHI, H.; YANG, Y.; LIU, M.; YAN, C.; YUE, H.; ZHOU, J. Occurrence and distribution of antibiotics in the surface sediments of the Yangtze Estuary and nearby coastal areas. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 83, p. 317–323, 2014.

SINGER, R. S.; WILLIAMS-NGUYEN, J. Human health impacts of antibiotic use in agriculture: A push for improved causal inference. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 19, p. 1–8, 2014.

SONG, C.; LI, L.; ZHANG, C.; QIU, L.; FANA, L.; WU, W.; MENG, S.; HU, G.; CHEN, J.; LIU, Y.; MAO, A. Dietary risk ranking for residual antibiotics in cultured aquatic products around Tai Lake, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 144, p. 252–257, 2017.

SOTO-RODRIGUEZ, S. A.; GOMEZ-GIL, B.; LOZANO-OLVERA, R.; BETANCOURT-LOZANO, M.; MORALES-COVARRUBIAS, M. S. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, DC, v. 81, p. 1689-1699, 2015.

SU, H.; LIU, S.; HU, X.; XU, X.; XU, W.; XU, Y.; LI, Z.; WEN, G.; LIU, Y.; CAO, Y. Occurrence and temporal variation of antibiotic resistance genes (ARGs) in shrimp aquaculture: ARGs dissemination from farming source to reared organisms. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 607–608, p. 357–366, 2017.

SUANTIKA, G.; SITUMORANGA, M. L.; KURNIAWANB, J. B.; PRATIWI, S. A.; ADITIAWATIA, P.; ASTUTIA, D. I.; AZIZAH, F. F. N.; DJOHANA, Y. A.; ZUHRID, U.; SIMATUPANGE, T. M. Development of a zero water discharge (ZWD) - Recirculating aquaculture system (RAS) hybrid system for super intensive white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) culture under low salinity conditions and its industrial trial in commercial shrimp urban farming in Gresik, East Java, Indonesia. **Aquacultural Engineering**, London, v. 82, p. 12-24, 2018.

TASSANAKAJON, A.; RIMPHANITCHAYAKIT, V.; VISETNAN, S.; PITI, A.; SOMBOONWIWAT, K.; CHAROENSAPSRI, W.; TANG, S. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 80, p. 81-93, 2018.

THITAMADEE, S.; PRACHUMWAT, A.; SRISALA, J.; JAROENLAK, P.; SALACHAN, P. V.; SRITUNYALUCKSANA, K.; FLEGEL, T. W.; ITSATHITPHAISARN, O. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 452, p. 69–87, 2016.

THUY, H. T.; NQA, I. P.; LOAN, T. T. Antibiotic contaminants in coastal wetlands from Vietnamese shrimp farming. **Environmental Science and Pollution Research International**, Landsberg, v. 18, p. 835–841, 2011.

THUY, T. T. H.; LOAN, T. C. T.; LE, N. P.; DAO, Q. P. A preliminary study on the phytoremediation of antibiotic contaminated sediment. **International Journal of Phytoremediation**, Boca Raton, v. 15, p. 65-76, 2013.

TLILI, I.; CARIA, G.; OUDDANE, B.; GHORBEL-ABID, I.; TERNANE, R.; TRABELSI-AYADI, M.; NET, S. Simultaneous detection of antibiotics and other drug residues in the dissolved and particulate phases of water by an off-line SPE combined with on-line SPE-LC-MS/MS: Method development and application. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 563–564, p. 424-433, 2016.

UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE. **VSDB - Veterinary Substances Database**. Project: Creating tools for a comprehensive relational database of physicochemical and toxicological data for veterinary substances. University of Hertfordshire, UK, Agriculture & Environment Research Unit (AERU), 2019. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/index.htm>. Acesso em: 07 jan. 2019.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Bioanalytical method validation**: Guidance for industry. Silver Spring, MD, 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>. Acesso em: 07 jan. 2019.

USEPA. National Aquatic Resources Surveys. **Indicators used in the National Aquatic Resources Surveys**. Washington, DC, 2019. Disponível em: <https://www.epa.gov/national-aquatic-resource-surveys/indicators-used-national-aquatic-resource-surveys>

USEPA. Science and Ecosystems Support Division. Region 4. **Field measurement of oxidation-reduction-potencial (ORP)**. Athens, GO, 2017a. 22 p. (SESDPROC-113-R2). Disponível em: https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-07/documents/field_measurement_of_orp113_af.r2.pdf

USEPA. Science and Ecosystems Support Division. Region 4. **Field turbidity measurement**. Athens, GO, 2017b. 13 p. (SESDPROC-103-R4). Disponível em: https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-07/documents/field_turbidity_measurement103_af.r4.pdf

VARDALI, S. C.; SAMANIDOUB, V. F.; KOTZAMANIS, Y. P. Development and validation of an ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight-mass spectrometry (in MSE mode) method for the quantitative determination of 20 antimicrobial residues in edible muscle tissue of European sea bass. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1575, p. 40–48, 2018.

VILLAR-PULIDO, M.; GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F.; MARTOS, N. R.; MOLINA-DÍAZ, A. Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Talanta**, Oxford, v. 85, p. 1419–1427, 2011.

WEI, Y.; ZHANG, Y.; XU, J.; GUO, C.; LI, L.; FAN, W. Simultaneous quantification of several classes of antibiotics in water, sediments, and fish muscles by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, Beijing, v. 8, n. 3, p. 357-371, 2014. DOI 10.1007/s11783-013-0580-6.

YANG, J.; WANG, C.; SHU, C.; LIU, L.; GENG, J.; HU, S.; FENG, J. Marine sediment bacteria harbour antibiotic resistance genes highly similar to those found in human pathogens. **Microbial Ecology**, New York, v. 65, p. 975–981, 2013.

YANG, S.; CHA, J.; CARLSON, K. Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1097, n. 1-2, p. 40-53, 2005.

YAO, L.; WANG, Y.; TONG, L.; LI, Y.; DENG, Y.; GUO, W.; GAN, Y. Seasonal variation of antibiotics concentration in the aquatic environment: a case study at Jiangnan Plain, central China. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 527–528, p. 56–64, 2015.

YUAN, J.; NI, M.; LIU, M.; ZHENG, Y.; GU, Z. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a typical estuary aquaculture region of Hangzhou Bay, China. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 138, p. 376-384, 2019.

ZHANG, Q. Q.; YING, G. G.; PAN, C. G.; LIU, Y. S.; ZHAO, J. L. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 49, p. 6772–6782, 2015.

ZHANG, R.; PEI, J.; ZHANG, R.; WANG, S.; ZENG, W.; HUANG, D.; WANG, Yi.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; YU, K. Occurrence and distribution of antibiotics in mariculture farms, estuaries and the coast of the Beibu Gulf, China: Bioconcentration and diet safety of seafood. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 154, p. 27–35, 2018.

ZHAO, L.; LUCAS, D.; LONG, D.; RICHTER, B.; STEVENS, J. Multi-class multi-residue analysis of veterinary drugs in meat using enhanced matrix removal lipid cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1549, p. 14-24, 2018.

ZHAO, S.; LIU, X.; CHENG, D.; LIU, G.; LIANG, B.; CUI, B.; BAI, J. Temporal-spatial variation and partitioning prediction of antibiotics in surface water and sediments from the intertidal zones of the Yellow River Delta, China. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 569–570, p. 1350-1358, 2016.

ZHOU, J. L.; MASKAOUI, K.; LUFADJEU, A. Optimization of antibiotic analysis in water by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 731, p. 32-39, 2012.

ZHOU, L. J.; YING, G. G.; LIU, S.; ZHAO, J. L.; CHEN, F.; ZHANG, R. Q.; PENG, F. Q.; ZHANG, Q. Q. Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1244, p. 123-138, 2012.

ANEXOS

Anexo A - Tabela 1 - Resultados de estabilidade de longa duração dos antibióticos na matriz água, acondicionada em cartuchos SPE HLB Oasis 500 mg, 6 mL

| Água em cartuchos SPE | | | | |
|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Antibióticos | 60 dias | | 90 dias | |
| | 30 ng mL⁻¹ | 60 ng mL⁻¹ | 30 ng mL⁻¹ | 60 ng mL⁻¹ |
| | REC (%) t1/t0 | | REC (%) t2/t0 | |
| Tetraciclínas | | | | |
| CTC | 103,14 | 124,92 | 894,92 | 665,7 |
| OTC | 121,78 | 174,71 | 300,06 | 323 |
| TC | 118,86 | 116,47 | 373,52 | 218,92 |
| Sulfonamidas | | | | |
| SDM | 115,91 | 125,63 | 134,95 | 118,19 |
| SMZ | 117,2 | 128,46 | 142,51 | 119,55 |
| STZ | 117,2 | 122,16 | 128,46 | 118,2 |
| Fluoroquinolonas | | | | |
| CFX | 75,95 | 66,45 | 167,35 | 125,19 |
| EFX | 84,95 | 40,05 | 346,07 | 169,83 |
| NFX | 61,18 | 56,09 | 137,31 | 111,05 |
| SAR | 97,59 | 96,58 | 170,54 | 128,53 |
| Anfenicóis | | | | |
| CAP | 134,95 | 123,32 | 146,25 | 130,54 |
| FF | 126,7 | 139,21 | 152,25 | 117,57 |

Anexo B - Tabela 2 - Resultados de estabilidade de longa duração dos antibióticos na matriz sedimentos

| Sedimentos | | | | |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Antibióticos | 35 dias | | 90 dias | |
| | 50 | 300 | 50 | 300 |
| | µg kg⁻¹ | µg kg⁻¹ | µg kg⁻¹ | µg kg⁻¹ |
| | REC (%) t1/t0 | | REC (%) t2/t0 | |
| Tetraciclínas | | | | |
| CTC | 75,95 | 91,63 | 111,66 | 98,19 |
| OTC | 122,41 | 52,14 | 46,27 | 86,39 |
| TC | 86,49 | 86,86 | 52,59 | 92,26 |
| Sulfonamidas | | | | |
| SDM | 48,56 | 141,3 | 69,86 | 18,61 |
| SMZ | 52,71 | 139,91 | 59,78 | 32,9 |
| STZ | 79,35 | 160,96 | 68,48 | 53,99 |
| Fluoroquinolonas | | | | |
| CFX | 76,89 | 82,4 | 63,22 | 52,44 |
| EFX | 64,36 | 121,84 | 62,44 | 27,36 |
| NFX | 67,97 | 108,07 | 37,87 | 51,54 |
| SAR | 70,68 | 88,71 | 65,92 | 11,84 |
| Anfenicóis | | | | |
| CAP | 104,25 | 99,99 | 98,54 | 14,64 |
| FF | 92,22 | 123,53 | 80,53 | 81,05 |

Anexo C - Tabela 3 - Resultados de estabilidade de longa duração dos antibióticos na matriz músculo de camarão

| Músculo de Camarão | | | | |
|---------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Antibióticos | 43 dias | | 105 dias | |
| | 50 µg kg⁻¹ | 300 µg kg⁻¹ | 50 µg kg⁻¹ | 300 µg kg⁻¹ |
| | REC (%) t1/t0 | | REC (%) t2/t0 | |
| Tetraciclinas | | | | |
| CTC | 105,04 | 128,74 | 105,05 | 124,86 |
| OTC | 69,41 | 68,86 | 69,4 | 71,6 |
| TC | 92,75 | 85,28 | 92,7 | 84,25 |
| Sulfonamidas | | | | |
| SDM | 92,21 | 86,74 | 92,2 | 84,58 |
| SMZ | 92,65 | 91,42 | 92,64 | 89,65 |
| STZ | 97,99 | 79,48 | 97,57 | 82,42 |
| Fluoroquinolonas | | | | |
| CFX | 75,36 | 60,05 | 72,06 | 67,68 |
| EFX | 100,22 | 116,05 | 100,22 | 112,54 |
| NFX | 78,78 | 72,72 | 68,5 | 69,95 |
| SAR | 77,56 | 58,95 | 77,56 | 57,64 |
| Anfenicóis | | | | |
| CAP | 90,01 | 88,6 | 90,01 | 85,13 |
| FF | 94,76 | 89,72 | 95,46 | 96,15 |